

脑震宁干预外周血来源外泌体对小胶质细胞诱导的神经元损伤的影响^Δ

高 丽*,赵 乐,武立雅,张唯依,李 难,魏楠楠,王永辉[#](山西中医药大学基础医学院,山西 晋中 030619)

中图分类号 R965;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)19-2393-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.19.06



摘要 **目的** 研究脑震宁干预外周血来源外泌体(Exo)对小胶质细胞BV-2诱导的神经元细胞HT22损伤的影响。**方法** 选取Wistar大鼠制备脑震宁(66.83 g/kg)干预外周血来源Exo(即NZN-Exo),同法制备生理盐水和吡拉西坦(1.62 g/kg)干预外周血来源Exo(即KB-Exo、PLXT-Exo),并进行鉴定。以1 μg/mL脂多糖(LPS)刺激BV-2细胞,制备经LPS刺激的上清液(同法制备未经LPS刺激的上清液)。将HT22细胞分为KB-Exo组(未经LPS刺激的上清液+KB-Exo)、模型组(即model组,经LPS刺激的上清液+KB-Exo)、PLXT-Exo组(经LPS刺激的上清液+PLXT-Exo)和NZN-Exo组(经LPS刺激的上清液+NZN-Exo),相应Exo的质量浓度均为50 μg/mL。培养24 h后,检测HT22细胞增殖情况(采用CCK-8法和EdU法),检测HT22细胞凋亡情况,观察HT22细胞超微结构,检测HT22细胞中白细胞介素1β(IL-1β)、IL-10、核因子κB(NF-κB)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)含量,以及TNF-α、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、胱天蛋白酶1(Caspase-1)、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的蛋白表达情况。**结果** 本研究成功制备KB-Exo、PLXT-Exo、NZN-Exo,各Exo均呈现出较为典型的“杯状”轮廓和膜结构“包裹”特征。与KB-Exo组相比,model组的细胞增殖率(CCK-8法和EdU法)、细胞中IL-10含量和Bcl-2蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$);细胞凋亡率和细胞中IL-1β、TNF-α、NF-κB含量以及NLRP3、TNF-α、Caspase-1、Bax蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);细胞体积膨胀,细胞膜不完整,核仁破裂,线粒体明显肿胀变形,空泡化严重。与model组相比,PLXT-Exo组、NZN-Exo组细胞上述定量指标均显著逆转($P<0.05$);细胞核大而圆,核膜完整,线粒体空泡化减少。**结论** 脑震宁干预外周血来源Exo可通过抑制炎症反应和细胞凋亡,减轻小胶质细胞诱导的神经元细胞HT22损伤。

关键词 脑震宁;小胶质细胞;神经元细胞;外泌体;凋亡;炎症

Effects of peripheral blood-derived exosomes intervened by Naozhenning on injury of neuron induced by microglia

GAO Li, ZHAO Le, WU Liya, ZHANG Weiyl, LI Nan, WEI Nannan, WANG Yonghui(College of Basic Medical Science, Shanxi University of Chinese Medicine, Shanxi Jinzhong 030619, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effects of peripheral blood-derived exosomes (Exo) intervened by Naozhenning (NZN) on injury of neuron cells HT22 induced by microglia BV-2 cells. **METHODS** Wistar rats were selected to prepare peripheral blood-derived Exo intervened by NZN (66.83 g/kg), referred to as NZN-Exo; peripheral blood-derived Exo intervened by normal saline and piracetam (PLXT, 1.62 g/kg) were prepared using the same method, denoted as KB-Exo and PLXT-Exo respectively, and all Exo were subsequently identified. Meanwhile, BV-2 cells were stimulated with 1 μg/mL lipopolysaccharide (LPS) to prepare LPS-stimulated supernatant, and non-LPS-stimulated supernatant was prepared following the same protocol. HT22 cells were divided into four groups: KB-Exo group (treated with non-LPS-stimulated supernatant+KB-Exo), model group (treated with LPS-stimulated supernatant+KB-Exo), PLXT-Exo group (treated with LPS-stimulated supernatant+PLXT-Exo), and NZN-Exo group (treated with LPS-stimulated supernatant+NZN-Exo), with the concentration of the corresponding Exo in all groups being 50 μg/mL. After 24 hours of culture, the proliferation of HT22 cells was detected by the CCK-8 assay and EdU assay; the apoptosis of HT22 cells was detected; the microstructure of HT22 cells was observed; the contents of interleukin-1β (IL-1β), IL-10, nuclear factor-κB (NF-κB), and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in HT22 cells

were measured, as well as the expression levels of TNF-α, NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), Caspase-1, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2-associated X protein (Bax). **RESULTS** KB-Exo, PLXT-Exo and NZN-Exo were successfully prepared, and all Exo exhibited typical cup-shaped contours and membrane-enclosed characteristics. Compared with KB-Exo group, model group showed significantly decreased cell proliferation rates (detected

Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82104972);山西省基础研究计划项目(No.202403021211146);山西省中医药管理局科研课题(No.2024ZYB041);山西中医药大学博士科研启动基金项目(No.2022BK019);山西中医药大学科技创新能力培育计划项目(No.2023PY-YS-03);山西省重点实验室建设项目(No.zyyyjs2024023)

* **第一作者** 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:方剂的现代药理学作用及其物质基础。E-mail:342014263@qq.com

通信作者 教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药理与方剂配伍作用研究。E-mail:wyh766188@sina.com

by CCK-8 and EdU), intracellular IL-10 levels, and Bcl-2 protein expression levels ($P<0.05$); while the cell apoptosis rate, intracellular levels of IL-1 β , TNF- α , and NF- κ B, as well as the expression levels of NLRP3, TNF- α , Caspase-1, and Bax proteins were significantly increased ($P<0.05$). Additionally, in the model group, the cells showed volume swelling, incomplete cell membrane, nucleolar rupture, significant swelling and deformation of mitochondria, and severe vacuolization. Compared with model group, the above quantitative indicators in the PLXT-Exo group and NZN-Exo group were significantly reversed ($P<0.05$), with large and round cell nuclei, intact nuclear membranes, and reduced mitochondrial vacuolization. **CONCLUSIONS** Peripheral blood-derived Exo intervened by naozhenning can alleviate the injury of neuronal cells HT22 by inhibiting inflammatory responses and cell apoptosis.

KEYWORDS Naozhenning; microglia; neuronal cells; exosomes; apoptosis; inflammation

创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)发生后的数分钟内,神经炎症反应便迅速开始;与此同时,脑内小胶质细胞也被激活,释放出大量的炎症因子,从而介导神经元损伤^[1]。相关研究发现,中重度的TBI或反复发生的轻度TBI患者脑内小胶质细胞M1表型的持续存在会限制脑组织修复^[2]。NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)作为神经炎症的关键驱动因子,被激活后可释放促炎因子[如白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等],进一步激活小胶质细胞并诱导神经元凋亡^[3]。目前,针对TBI的治疗药物存在疗效有限且针对性较弱的不足,因此开发新的治疗TBI的药物具有重要意义。

脑震宁为山西名方,由地黄、牡丹皮、当归等11种中药组成,具有活血通络、安神定志、化痰止呕的功效。本课题组前期研究发现,脑震宁含药血清对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小胶质BV-2细胞的神经炎症具有改善作用^[4],但具体作用机制尚不明确。外泌体(exosomes, Exo)是机体细胞所分泌的一种膜性小囊泡,是细胞间信息传递的重要介质^[5]。近年来研究表明,Exo具有天然靶向能力,是良好的天然新型药物递送系统,其中来自血液的Exo具有天然的脑靶向能力,能够通过转铁蛋白受体介导的内吞作用穿过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)^[6-7]。基于此,本研究以小胶质BV-2细胞诱导的神经元HT22细胞损伤模型模拟TBI,并考察脑震宁干预外周血来源Exo对该模型的影响,以期为进一步研发更精准、高效的TBI治疗药物提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有ImageQuant LAS500型化学发光仪(美国Alpha Innotech公司), Megafuge 8R型低温高速离心机、Varioskan LUX型多功能全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司), Ts2R型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司), HT7800型透射电子显微镜(日本Hitachi公司), DYY-6C型电泳和转膜仪(北京六

一生物科技有限公司), N30E型纳米流式检测仪(厦门福流生物科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

脑震宁处方包括生地黄、牡丹皮、当归、丹参、川芎、炒酸枣仁、柏子仁、陈皮、竹茹、茯苓、地龙11种中药饮片(处方比例为8:6:8:15:6:10:10:10:10:10:6),各饮片购自北京同仁堂晋中药店有限责任公司,经山西中医药大学基础医学院王永辉教授鉴定均为真品。

吡拉西坦片(批号4201008,规格0.4 g)购自东北制药集团沈阳第一制药有限公司;无Exo胎牛血清(批号UR5020)购自上海宇玫博生物公司;DMEM高糖培养基(批号12491-015)购自美国Gibco公司;LPS(批号L8880)购自北京索莱宝科技有限公司;CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒(批号BS350B)购自北京兰杰柯科技有限公司;EdU细胞增殖检测试剂盒、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(批号分别为MA0424-1、MA0223)购自大连美仑生物技术有限公司;IL-1 β 、TNF- α 、核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、IL-10酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号分别为JL1844、JL10484、E-EL-R0012c、JLW20242)均购自上海江莱生物科技有限公司;荧光标记的CD9、CD81抗体(批号分别为P40240、HY-P74264)购自美国MedChemExpress公司;兔源 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(批号AP0060)购自安诺伦(北京)生物科技有限公司;兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体(批号GB11002-50)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;兔源TNF- α 多克隆抗体(批号300-01A)购自美国PeproTech公司;鼠源胱天蛋白酶1(Caspase-1)、兔源NLRP3多克隆抗体(批号分别为Z32358、AF9135)购自江苏亲科生物研究中心有限公司;兔源B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)多克隆抗体(批号ab182858)购自英国Abcam公司;鼠源Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)单克隆抗体(批号50599-2-Ig)购自美国Proteintech公司;山羊抗兔免疫球蛋白G二抗、山羊抗鼠免疫球蛋白G二抗(批号分别为BA1055、BA1050)购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 动物与细胞

本研究所用动物为8周龄SPF级Wistar雄性大鼠,共40只,体重(250±20)g,均购于北京维通利华实验动物有限公司,动物生产许可证号为SCXK(京)2021-0011。大鼠饲养于山西中医药大学实验管理中心SPF级动物房,自由饮水与进食,环境温度(22±3)℃、相对湿度40%~50%、自然昼夜节律。本研究涉及的所有动物实验均符合动物伦理学操作要求,且经山西中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号为2021DW031)。

小鼠小胶质细胞BV-2(货号TCM-C718)购自苏州海星生物科技有限公司;小鼠海马神经元细胞HT22(货号FH1027)购自上海富衡生物科技有限公司。

2 方法

2.1 脑震宁药液的制备

根据处方比例称取生地黄、牡丹皮、当归、丹参、川芎、炒酸枣仁、柏子仁、陈皮、竹茹、茯苓、地龙饮片适量,加入10倍量水浸泡30 min后大火烧开,之后转小火煎煮40 min,过滤;药渣再次加入8倍量水,用大火煮沸后转小火煎煮40 min,过滤;将两次煎出的药液混合,水浴加热浓缩成质量浓度为6.68 g/mL的脑震宁药液(以生药量计)。

2.2 Exo的制备

将Wistar大鼠随机分为空白组(生理盐水, $n=20$)、吡拉西坦组(阳性对照,1.62 g/kg, $n=10$)、脑震宁组(66.83 g/kg, $n=10$),其中脑震宁组和吡拉西坦组大鼠灌胃相应药液,剂量均参考文献[8]设置,空白组大鼠灌胃等体积生理盐水。所有大鼠每天灌胃2次,连续7 d。末次给药后1 h,各组大鼠腹主动脉取血,血样以3 500 r/min离心20 min,收集上层血清^[9],然后采用超速离心法分离提取Exo,即得外周血来源Exo。按以上步骤得到空白组Exo(即KB-Exo)、吡拉西坦组Exo(即PLXT-Exo)、脑震宁组Exo(即NZN-Exo),采用BCA法对其进行蛋白浓度测定,再进行后续实验。

2.3 Exo的鉴定

取“2.2”项下KB-Exo、PLXT-Exo、NZN-Exo适量,滴加在铜网上沉淀1 min,然后用滤纸吸去浮液;加醋酸双氧铀继续沉淀1 min,滤纸吸去浮液,常温干燥数分钟,然后采用透射电子显微镜观察各Exo形态并采集图像。取KB-Exo、PLXT-Exo、NZN-Exo适量,采用纳米流式检测仪测量Exo粒径(每种样品平行测定3次,取平均值)。另外,取上述3组Exo适量,以磷酸盐缓冲液(PBS)稀释后,加入荧光标记的抗体CD9和CD81,37℃避光孵育30 min;加入预冷的PBS,以30 000 r/min超速离心70 min,取上清液再次以同样的条件超速离心;去除上清液后用PBS重悬,使用纳米流式检测仪检测各Exo表面抗体CD9和CD81的阳性率。

2.4 细胞造模、分组与给药

取对数生长期的BV-2细胞适量,加入1 μg/mL LPS刺激细胞12 h,换液后继续培养12 h,取上清液刺激HT22细胞以复制损伤模型;另制备未经LPS刺激的BV-2细胞上清液。取对数生长期的HT22细胞分为KB-Exo组(未经LPS刺激的上清液+KB-Exo)、模型组(即model组,经LPS刺激的上清液+KB-Exo)、PLXT-Exo组(经LPS刺激的上清液+PLXT-Exo)和NZN-Exo组(经LPS刺激的上清液+NZN-Exo),各组相应Exo的浓度均为50 μg/mL(浓度根据预实验结果设置)。

2.5 HT22细胞增殖能力检测

2.5.1 CCK-8法检测

将HT22细胞(细胞密度为 4×10^4 个/mL,下同)接种于96孔板,按“2.4”项下方法造模、分组与给药(经/未经LPS刺激的上清液加入量为100 μL,下同),并设置调零孔(只含培养基不含细胞),然后置于培养箱中培养24 h;加入CCK-8溶液处理4 h,采用酶标仪于450 nm波长下测定光密度值,并计算细胞增殖率,细胞增殖率(%)=(实验组光密度值-调零孔光密度值)/(KB-Exo组光密度值-调零孔光密度值)×100%。以上每组样本数为6。

2.5.2 EdU法检测

将HT22细胞接种于6孔板,按“2.4”项下方法造模、分组与给药,培养24 h后收集细胞,加入500 μL EdU工作液孵育1~2 h,去除工作液;加入固定液孵育20 min,洗涤细胞3次,加入通透液孵育10 min,再次洗涤细胞3次;加入500 μL Click反应液(现用现配),室温避光孵育30 min,洗涤细胞3次;加入Hoechst 33342染色液室温避光孵育10 min,洗涤细胞3次,置于荧光显微镜下观察各组细胞染色情况(EdU阳性细胞为绿色),计算细胞增殖率,细胞增殖率(%)=EdU阳性细胞数/细胞总数×100%。以上每组样本数为6。

2.6 HT22细胞凋亡情况检测

采用TUNEL法检测。将HT22细胞接种于6孔板,按“2.4”项下方法造模、分组与给药,培养24 h后收集细胞,以4%多聚甲醛室温固定30 min,再用0.3% Triton X-100溶液室温孵育10 min;加入TUNEL工作液适量,置于培养箱中孵育60 min,然后加入DAPI溶液(1 μg/mL)避光标记细胞核约10 min;采用荧光显微镜观察细胞凋亡情况,并拍照。每组随机选取6个视野,对凋亡细胞(呈绿色)和正常细胞(呈蓝色)分别进行计数,并计算细胞凋亡率,细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/(凋亡细胞数+正常细胞数)×100%。以上每组样本数为6。

2.7 HT22细胞超微结构观察

采用铀-铅染色法观察。将HT22细胞接种于6孔板,按“2.4”项下方法造模、分组与给药,培养24 h后收集细胞,于4℃条件下以1 500 r/min离心10 min,加入

2.5%戊二醛溶液固定细胞,依次梯度脱水、包埋、切片、染色后,采用透射电子显微镜观察细胞形态,并拍照。

2.8 HT22细胞中IL-1β、TNF-α、NF-κB、IL-10的含量检测

采用ELISA法检测。将HT22细胞接种于96孔板,按“2.4”项下方法造模、分组与给药,培养24 h后收集细胞,用预冷的无菌PBS洗涤2~3次并重悬,采用细胞破碎仪充分破碎细胞,于4℃条件下以1 000 r/min离心15 min;收集上清液,按照ELISA试剂盒说明书方法检测各组细胞中IL-1β、TNF-α、NF-κB、IL-10的含量。以上每组样本数为6。

2.9 HT22细胞中炎症和凋亡相关蛋白表达的检测

采用Western blot法检测。将HT22细胞接种于6孔板,按“2.4”项下方法造模、分组与给药,培养24 h后收集细胞,加入适量RIPA裂解液,于4℃条件下以12 000 r/min离心15 min,收集细胞上清液,采用BCA法检测蛋白浓度,然后加入上样缓冲液于100℃煮沸10 min,使蛋白充分变性。待冷却后,上样等量蛋白(30 μg),经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并湿转到PVDF膜上,加入封闭液封闭30 min;依次加入β-actin、GAPDH、Bax、Bcl-2、Caspase-1、TNF-α、NLRP3一抗(稀释度分别为1:5 000、1:5 000、1:2 000、1:2 000、1:1 000、1:1 500、1:2 000),置于4℃条件下孵育12~16 h;次日回收一抗并用TBST洗涤3次,加入相应二抗(稀释度为1:5 000),室温下孵育2 h;用TBST洗涤3次,滴加ECL发光液在化学发光仪上对条带扫描成像,以目的蛋白与内参蛋白(β-actin或GAPDH)的条带灰度比值表示各目的蛋白的表达水平。以上每组样本数为3。

2.10 统计学方法

采用GraphPad Prism软件和SPSS 21.0软件进行图表绘制和统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 Exo的鉴定结果

透射电子显微镜观察结果(图1)显示,KB-Exo、PLXT-Exo、NZN-Exo的形态可见类圆形囊泡结构,边界清晰,呈现出较为典型的“杯状”轮廓和膜结构“包裹”特征;其平均粒径分别为88.8、90.1、92.2 nm,符合Exo的粒径范围;其表面抗体CD9和CD81的表达强度均较高,抗体CD9的阳性率分别为(19.00±0.94)%、(14.60±1.03)%、(18.20±1.09)%,抗体CD81的阳性率分别为(9.03±0.23)%、(6.12±0.49)%、(10.53±0.44)%。这提示,本研究成功制备KB-Exo、PLXT-Exo、NZN-Exo,可用于后续实验。

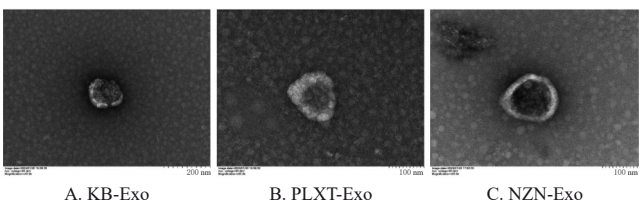


图1 不同Exo的透射电子显微镜图

3.2 NZN-Exo对HT22细胞增殖的影响

CCK-8法和EdU法检测结果(表1)显示,与KB-Exo组相比,model组经两种方法检测的细胞增殖率均显著降低($P<0.05$);与model组相比,PLXT-Exo组、NZN-Exo组经两种方法检测的细胞增殖率均显著升高($P<0.05$)。各组HT22细胞增殖情况的显微图可扫描本文首页二维码进入“增强出版”页面查看附图1。

表1 各组HT22细胞经两种方法检测的细胞增殖率比较($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	CCK-8法	EdU法
KB-Exo组	134.46±4.11	74.87±1.46
model组	70.55±3.01 ^a	32.01±2.23 ^a
PLXT-Exo组	100.23±3.01 ^b	56.69±1.46 ^b
NZN-Exo组	110.58±6.35 ^b	63.74±4.65 ^b

a:与KB-Exo组比较, $P<0.05$;b:与model组比较, $P<0.05$ 。

3.3 NZN-Exo对HT22细胞凋亡的影响

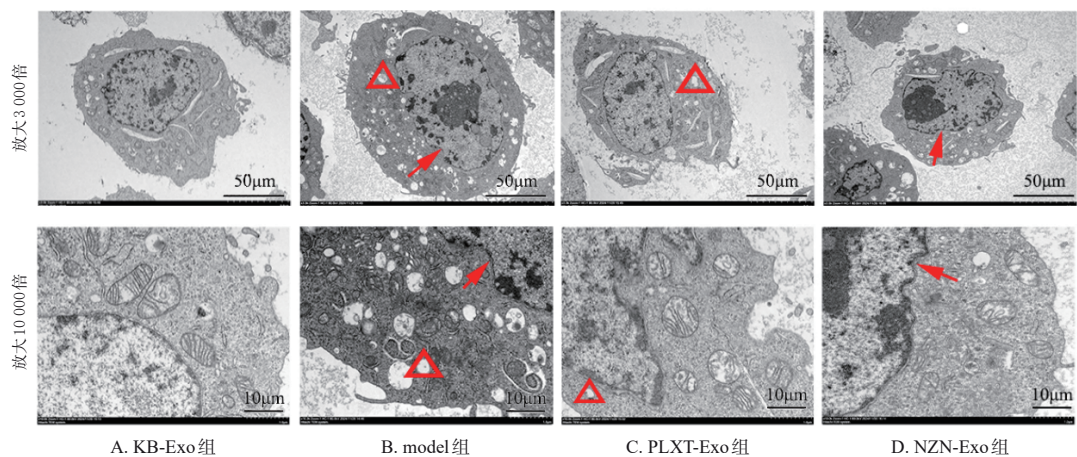
KB-Exo组、model组、PLXT-Exo组、NZN-Exo组细胞凋亡率分别为(2.03±0.97)%、(53.22±3.16)%、(21.87±8.06)%、(32.07±4.95)%。与KB-Exo组相比,model组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与model组相比,PLXT-Exo组、NZN-Exo组细胞凋亡率均显著降低($P<0.05$)。各组HT22细胞凋亡情况的显微图可扫描本文首页二维码进入“增强出版”页面查看附图2。

3.4 NZN-Exo对HT22细胞超微结构的影响

透射电子显微镜观察结果(图2)显示,KB-Exo组细胞核大而圆,核膜完整,核仁可见,线粒体呈圆形、椭圆形,内嵴清晰可见;model组细胞体积膨胀,且部分细胞变形,细胞膜不完整,核膜皱缩严重,核仁破裂,线粒体明显肿胀变形,空泡化严重,内嵴结构减少或消失;PLXT-Exo组细胞核大而圆,核膜完整,核仁破裂,内嵴结构隐约可见,线粒体结构模糊,空泡化减少;NZN-Exo组细胞核大而圆,核膜完整,核仁可见,线粒体呈圆形且空泡化减少,内嵴结构完整。

3.5 NZN-Exo对HT22细胞中IL-1β、TNF-α、NF-κB、IL-10含量的影响

与KB-Exo组相比,model组细胞中IL-1β、TNF-α、NF-κB含量均显著升高,IL-10含量均显著降低($P<0.05$);与model组相比,PLXT-Exo组、NZN-Exo组细胞中IL-1β、TNF-α、NF-κB含量均显著降低,IL-10含量均显著升高($P<0.05$)。结果见表2。



注:红色三角形表示空泡化;红色箭头表示核膜。

图2 各组HT22细胞超微结构显微图

表2 各组HT22细胞IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、IL-10含量比较($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ng/mL}$)

组别	IL-1 β	TNF- α	NF- κ B	IL-10
KB-Exo组	453.23 $\pm$ 13.16	333.18 $\pm$ 9.98	135.22 $\pm$ 3.83	31.14 $\pm$ 6.57
model组	949.54 $\pm$ 74.89 ^a	581.76 $\pm$ 22.18 ^a	293.28 $\pm$ 7.34 ^a	14.30 $\pm$ 2.60 ^a
PLXT-Exo组	781.20 $\pm$ 15.18 ^b	442.47 $\pm$ 6.46 ^b	198.23 $\pm$ 9.01 ^b	22.25 $\pm$ 1.11 ^b
NZN-Exo组	872.50 $\pm$ 40.56 ^b	435.09 $\pm$ 17.79 ^b	221.72 $\pm$ 5.11 ^b	24.53 $\pm$ 2.37 ^b

a:与KB-Exo组比较, $P<0.05$;b:与model组比较, $P<0.05$ 。

3.6 NZN-Exo对炎症和凋亡相关蛋白表达的影响

与KB-Exo组相比,model组细胞中NLRP3、TNF- α 、Caspase-1、Bax蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);与model组相比,PLXT-Exo组、NZN-Exo组细胞中NLRP3、TNF- α 、Caspase-1、Bax蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表3、图3。

表3 各组HT22细胞炎症和凋亡相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	NLRP3/GAPDH	TNF- α /GAPDH	Caspase-1/GAPDH	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin
KB-Exo组	1.94 $\pm$ 0.25	0.78 $\pm$ 0.86	0.99 $\pm$ 0.03	2.35 $\pm$ 0.24	2.81 $\pm$ 0.78
model组	5.05 $\pm$ 0.10 ^a	3.16 $\pm$ 0.23 ^a	1.81 $\pm$ 0.03 ^a	4.78 $\pm$ 0.15 ^a	1.24 $\pm$ 0.09 ^a
PLXT-Exo组	2.83 $\pm$ 0.23 ^b	2.14 $\pm$ 0.04 ^b	1.52 $\pm$ 0.20 ^b	2.17 $\pm$ 0.16 ^b	2.20 $\pm$ 0.30 ^b
NZN-Exo组	2.45 $\pm$ 0.05 ^b	2.49 $\pm$ 0.08 ^b	1.59 $\pm$ 0.14 ^b	2.34 $\pm$ 0.15 ^b	2.43 $\pm$ 0.26 ^b

a:与KB-Exo组比较, $P<0.05$;b:与model组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

脑震宁的主要功效为活血通络、安神定志、化痰止呕,可用于治疗脑外伤引起的头痛头晕、烦躁失眠、惊悸健忘、恶心呕吐等症状^[10-11]。方中,生地黄清热凉血;牡丹皮活血止痛;当归、丹参、川芎化瘀通络;炒酸枣仁、柏子仁养血安神、宁心定志;陈皮、茯苓、竹茹和胃降逆、化痰止呕;地龙清热通络;诸药合用,共同发挥活血化痰、降逆化痰的作用。

在脑部疾病的治疗研究中,载药Exo日益受到研究者关注。Exo作为人体内源性成分,可穿过BBB,具有

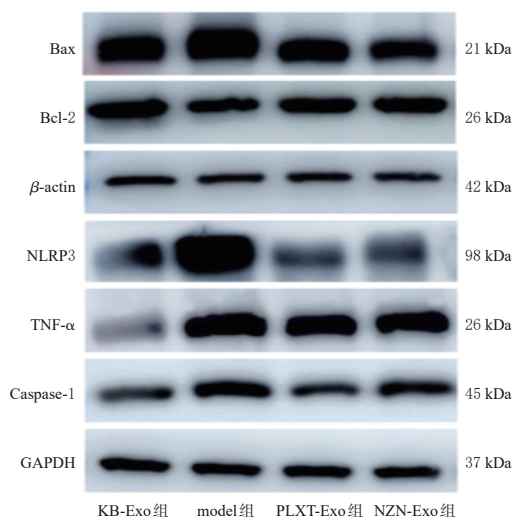


图3 各组HT22细胞中炎症和凋亡相关蛋白表达的电泳图

粒径小、免疫原性低、稳定性强、递送效率高等特点^[4]。Exo穿越BBB的主要机制在于其表面配体与脑微血管内皮细胞受体之间的相互作用。Yuan等^[12]研究指出,幼稚巨噬细胞Exo可借助其淋巴细胞功能相关抗原1、细胞间黏附分子1与脑微血管内皮细胞上的碳水化合物结合性C型凝集素受体相互作用,进而成功穿越BBB进入脑内。Qi等^[13]研究表明,Exo还能通过与脑微血管内皮细胞上Toll样受体4之间的特异性主动靶向作用穿越BBB进入脑内。基于此,本研究采用脑震宁干预外周血来源Exo,观察其对海马神经元细胞HT22炎症反应的改善作用。吡拉西坦可激活腺苷酸激酶,增加大脑三磷酸腺苷/二磷酸腺苷比值,促进磷脂、蛋白质合成,减少神经元凋亡;同时,其还可调节神经递质平衡,间接促进抗炎因子如IL-10的分泌,抑制炎症反应^[14],故本研究选择其干预外周血来源Exo作为阳性对照。

颅脑损伤可造成短暂性或永久性的中枢神经系统损伤,神经炎症反应是中枢神经系统固有的免疫应答机制,原发性和继发性损伤均可激活神经炎症反应^[15]。颅

脑损伤后,受损组织中的细胞会释放如TNF- α 、IL-1 β 、NLRP3等炎症因子,激活神经元中NF- κ B等炎症信号通路,促使神经元释放更多炎症因子,进一步放大炎症反应,进而引起神经元功能障碍;该损伤还可使脑组织中的小胶质细胞和星形胶质细胞活化,释放大炎症因子作用于神经元^[16]。Caspase-1是炎症小体的关键效应分子,参与炎症反应的主要过程;当NLRP3炎症小体被激活后,可促进Caspase-1活化,进一步推动炎症级联反应^[17]。相反,IL-10是一种抗炎因子,其可抑制炎症反应,对神经元起到保护作用^[18]。另外,Bax和Bcl-2蛋白发挥细胞凋亡“主开关”的作用,两者共同调节细胞凋亡进程^[19]。

本研究结果显示,LPS刺激BV-2细胞产生的上清液可导致HT22细胞中炎症因子IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B含量和NLRP3、TNF- α 、Caspase-1、Bax蛋白表达水平以及细胞凋亡率均升高,细胞增殖率(CCK-8法和EdU法检测)、IL-10含量和Bcl-2蛋白表达水平均降低,细胞膨胀变形、细胞膜不完整、空泡化严重。这提示HT22细胞发生了炎症反应和凋亡,进而诱发了神经元损伤。经过脑震宁干预外周血来源Exo作用后,上述定量分析指标均显著逆转,细胞核大而圆,核膜完整,核仁可见,线粒体呈圆形且空泡化减少,内嵴结构完整。这提示脑震宁干预外周血来源Exo可抑制HT22细胞的炎症反应和凋亡,进而减轻神经元损伤。

综上所述,脑震宁干预外周血来源Exo可通过抑制炎症反应和细胞凋亡,减轻小胶质细胞诱导的神经元细胞HT22损伤。本研究采用BV-2细胞/HT22细胞共培养系统模拟了神经炎症损伤,但体外模型无法完全复现体内BBB、胶质细胞互作等复杂机制,后续需结合动物模型验证脑震宁干预外周血来源Exo的体内疗效。

参考文献

[1] SHI G H, LIU L, CAO Y Y, et al. Inhibition of neutrophil extracellular trap formation ameliorates neuroinflammation and neuronal apoptosis via STING-dependent IRE1 α /ASK1/JNK signaling pathway in mice with traumatic brain injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 222.

[2] 付兆霖, 杨润梓, 郝鹏. 健康和脑损伤下小胶质细胞在成年海马神经发生中的调节作用[J]. *中国科学: 生命科学*, 2023, 53(6): 775-788.

[3] 陈睿, 薛国芳. NLRP3炎症小体在癫痫发生神经炎症中的研究进展[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2024, 27(1): 128-132.

[4] 王钱, 谭贝西, 王恬恬, 等. 脑震宁含药血清对Erastin诱导HT22细胞铁死亡的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(11): 53-59.

[5] JIANG W, WU Y, PANG A L, et al. M1-type microglia-derived exosomes contribute to blood-brain barrier da-

mage[J]. *Brain Res*, 2024, 1835: 148919.

[6] 杨浩, 龙乾发. 外泌体作为载体在中枢神经系统疾病中的研究进展[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2024, 23(3): 86-92.

[7] QU M K, LIN Q, HUANG L Y, et al. Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson's disease[J]. *J Control Release*, 2018, 287: 156-166.

[8] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. *中药新药与临床药理*, 1999, 10(2): 95-98.

[9] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 398-402.

[10] 卢紫娟, 刘海霞, 李昆, 等. 基于网络药理学的脑震宁颗粒治疗脑外伤的机制分析[J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3531-3540.

[11] 王学建, 季炜鹏. 脑震宁治疗脑外伤后头痛53例疗效观察[J/OL]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2017, 3(5): 292-293[2025-05-01]. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChVQZXJpb2RpY2FsQ0hJMjAyNTA2MjISFXpoc2pjc3-drZHp6ejlwMTcwNTAwOBoIMjlsbjN3N3g%3D>.

[12] YUAN D F, ZHAO Y L, BANKS W A, et al. Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain[J]. *Biomaterials*, 2017, 142: 1-12.

[13] QI Y, GUO L, JIANG Y B, et al. Brain delivery of quercetin-loaded exosomes improved cognitive function in AD mice by inhibiting phosphorylated tau-mediated neurofibrillary tangles[J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 745-755.

[14] 王燕, 路文革, 孔羽, 等. 吡拉西坦联合银杏叶片治疗缺血性脑卒中后认知障碍的疗效及患者血清炎症因子、Lp-PLA2水平变化[J]. *临床研究*, 2025, 33(4): 123-126.

[15] KWON H S, KOH S H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes[J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9(1): 42.

[16] BARKHOUDARIAN G, HOVDA D A, GIZA C C. The molecular pathophysiology of concussive brain injury[J]. *Clin Phys Med*, 2011, 30(1): 33-48.

[17] SONG Y Y, LI Z W, HE T T, et al. M2 microglia-derived exosomes protect the mouse brain from ischemia-reperfusion injury via exosomal miR-124[J]. *Theranostics*, 2019, 9(10): 2910-2923.

[18] KITAOKA S. Microglia regulate neuronal and behavioural functions under physiological and pathological conditions[J]. *J Biochem*, 2023, 173(3): 153-157.

[19] GITEGO N, AGIANIAN B, MAK O W, et al. Chemical modulation of cytosolic BAX homodimer potentiates BAX activation and apoptosis[J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 8381.

(收稿日期: 2025-05-03 修回日期: 2025-07-24)

(编辑: 唐晓莲)