

## • 实验研究 •

## 雷公藤甲素通过上调 miR-137 调控小胶质细胞极化改善大鼠抑郁样行为

刘若楠, 古力巴克然木 阿布拉, 沈小琴, 张丞\*

新疆维吾尔自治区人民医院 临床心理科, 新疆 乌鲁木齐 830001

**摘要:** **目的** 探讨雷公藤甲素通过上调 miR-137 调控小胶质细胞极化改善抑郁症的作用及潜在分子机制。**方法** 50 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、雷公藤甲素组、雷公藤甲素+NC 抑制剂组和雷公藤甲素+miR-137 抑制剂组, 每组 10 只。通过构建慢性不可预知性应激(CUS)抑郁大鼠模型, 采用糖水偏好实验、强迫游泳实验和悬尾实验检测大鼠的行为学变化, 实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测大鼠海马中 miR-137 的表达水平, Western blotting 分别检测大鼠海马组织中离子钙接头蛋白分子-1(Iba-1)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和精氨酸酶 1(Arg1)蛋白表达, ELISA 法检测大鼠海马中神经递质 5-羟色胺(5-HT)和多巴胺(DA)水平以及炎症因子白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-10(IL-10)的水平。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠糖水偏好百分比显著降低, 不动时间显著增加, 体质量明显下降, 海马中 miR-137 表达显著降低, Iba-1 和 iNOS 蛋白以及 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平显著增加, Arg1 蛋白、5-HT、DA、IL-4 和 IL-10 水平显著降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 雷公藤甲素显著减轻大鼠的抑郁样行为, 上调 miR-137 表达, 降低海马组织中 Iba-1 和 iNOS 蛋白水平以及抑制 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平, 升高 Arg1 蛋白表达以及 5-HT、DA、IL-4 和 IL-10 水平( $P < 0.05$ )。miR-137 抑制剂处理后显著逆转了雷公藤甲素对小胶质细胞活化的抑制作用。**结论** 雷公藤甲素通过上调 miR-137 改善 CUS 诱导的大鼠抑郁样行为, 其机制可能与调节小胶质细胞极化有关。

**关键词:** 雷公藤甲素; 抑郁; miR-137; 小胶质细胞; 炎症反应**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)05-1021-07**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.05.001

## Triptolide ameliorates depression-like behavior in rats by up-regulating miR-137 and regulating microglia polarization

LIU Ruo-nan, GULIBAKERANMU Abula, SHEN Xiao-qin, ZHANG Cheng

Department of Clinical Psychology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China

**Abstract:** **Objective** To explore the role and potential molecular mechanism of triptolide in regulating microglial polarization through miR-137 in depression. **Methods** 50 SD rats were randomly divided into control group, model group, triptolide group, triptolide + NC inhibitor group and triptolide + miR-137 inhibitor group, and 10 rats in each group. The rat model of depression induced by chronic unpredictable stress (CUS) was established. The behavioral changes of rats were detected by sugar water preference test, forced swimming test and tail suspension test, and the expression of miR-137 in hippocampus was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Western blotting was used to detect the expression of ionized calcium junction protein-1 (Iba-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase 1 (Arg1) in rat hippocampus. The levels of neurotransmitters 5-hydroxytryptamine (5-HT) and dopamine (DA) and the contents of inflammatory factors such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 and IL-10 in the hippocampus of rats were measured by ELISA method. **Results** Compared with the control group, the percentage of sugar preference in the model group was significantly decreased, the immobility time was significantly increased, the body weight was significantly decreased, the expression of miR-137 in the hippocampus was significantly decreased, the levels of Iba-1 and iNOS protein and IL-1 $\beta$  and IL-6 were significantly increased, and the levels of Arg1 protein, 5-HT, DA, IL-4 and IL-10 were significantly decreased ( $P <$

收稿日期: 2023-02-22

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2021D01C513)

作者简介: 刘若楠, 女, 研究方向为抑郁症诊疗。E-mail: clover1710@163.com

\*通信作者: 张丞, 硕士, 研究方向为双相情感障碍。

0.05)。Compared with the model group, triptolide significantly alleviated the depressive behavior of rats, upregulated the expression of miR-137, decreased the levels of Iba-1 and iNOS protein and inhibited the levels of IL-1 $\beta$  and IL-6, and increased the expression of Arg1 protein and the levels of 5-HT, DA, IL-4 and IL-10 in hippocampus ( $P < 0.05$ ). miR-137 inhibitor treatment significantly reversed the inhibitory effect of triptolide on the activation of microglia. **Conclusion** Triptolide ameliorates CUS-induced depression-like behavior in rats by up-regulating miR-137, which may be related to the regulation of microglial polarization.

**Key words:** triptolide; depression; miR-137; microglia; inflammatory response

抑郁症是一种严重的情感障碍性精神疾病,常伴随情绪状态的改变,如快感缺失、睡眠和食欲障碍以及情绪低落,甚至认知障碍。抑郁症的发病率逐年增加,给人们带来巨大的健康和经济负担<sup>[1]</sup>,因此寻找有效的抗抑郁药迫在眉睫。越来越多的证据表明,炎症过程在抑郁症等心理障碍中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。促炎细胞因子的过度产生被认为是心理障碍发生的关键。小胶质细胞是机体的第一道防线和固有免疫系统,当病原体和危险信号入侵时被激活。研究发现小胶质细胞介导的神经炎症可能是治疗抑郁症的一个靶点<sup>[3]</sup>。雷公藤甲素是雷公藤的主要活性成分之一,可用于抑制免疫反应和抗炎反应。研究表明,雷公藤甲素抑制原代小胶质细胞产生肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )和一氧化氮 (NO),通过抑制小胶质细胞活化保护多巴胺能神经元免受炎症介导的损伤<sup>[4]</sup>。因此,雷公藤甲素可能通过抑制小胶质细胞活化在抑郁症中发挥积极作用。既往研究报道,miR-137 功能缺失小鼠表现出抑郁样行为、空间学习和记忆受损<sup>[5]</sup>。但雷公藤甲素是否通过调控 miR-137 改善抑郁样行为还尚不清楚。因此,本研究将从神经炎症的角度探讨雷公藤甲素通过 miR-137 调控小胶质细胞极化改善慢性不可预知性应激 (CUS) 诱导的抑郁样行为。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 50 只清洁级成年雄性 SD 大鼠,体质量 260~270 g,购于新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心,实验动物生产许可证号: SCXK (新) 2021-0001。大鼠置于通风笼中单独饲养,在 12 h 光照周期、相对温度 (22 $\pm$ 2)  $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 (60 $\pm$ 5) % 的条件下自由进食和饮水。所有实验均获得新疆维吾尔自治区人民医院动物保护委员会批准,动物实验伦理批号 20190806,并按照美国国立卫生研究院《实验动物护理和使用指南》执行。

**1.1.2 试剂和仪器** 雷公藤甲素 (质量分数 98.0%,批号 PHL80555) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; ELISA 试剂盒购自北京欣博盛生物科技有限公司;

实时荧光定量 PCR 试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; BCA 蛋白检测试剂盒购自上海觅拓生物科技有限公司; 离子钙接头蛋白分子-1 (Iba-1)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和精氨酸酶 1 (Arg1) 蛋白抗体均购自英国 Abcam 公司; ELISA 试剂盒购自上海恒远生物科技有限公司; NC 抑制剂 (antagomir 阴性对照) (货号 C06001)、miR-137 抑制剂 (货号 C09003) 购自上海吉玛技术有限公司。酶标仪购自瑞士 Tecan 公司; Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Agilent Technologies 公司; 凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 CUS 模型构建** 大鼠随机接受一系列不可预测轻度应激源,持续 5 周。应激条件: 禁食 24 h; 禁水 24 h; 夹尾 1 min; 湿垫料 24 h; 4  $^{\circ}\text{C}$  冰水浴或 40  $^{\circ}\text{C}$  温水浴 5 min; 24 h 光照或黑暗; 束缚 2 h; 鼠笼 45 $^{\circ}$  倾斜 24 h。大鼠每天随机暴露于 1 种应激或 2 种应激,并且同种应激不连续出现<sup>[7]</sup>。

**1.2.2 实验动物分组** 将 50 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、雷公藤甲素组、雷公藤甲素+NC 抑制剂组和雷公藤甲素+miR-137 抑制剂组,每组 10 只。雷公藤甲素组大鼠在造模后 ip 5% 二甲基亚砷溶解的雷公藤甲素 0.1 mg/(kg·d),连续 10 d<sup>[6]</sup>。雷公藤甲素+NC 抑制剂组和雷公藤甲素+miR-137 抑制剂组大鼠在造模后,以 10 mg/kg 尾 iv 20  $\mu\text{mol/L}$  的 NC 抑制剂或 miR-137 抑制剂,然后 ip 雷公藤甲素 0.1 mg/(kg·d),连续 10 d。

### 1.2.3 行为学实验

(1) 糖水偏好实验: 实验开始时,在每个笼内随机放置 2 个水瓶 (1% 蔗糖和水),12 h 后将 2 个瓶子进行互换,最后计算大鼠的糖水偏好度。

糖水偏好度 = 蔗糖摄入量 / (蔗糖摄入量 + 水摄入量)

(2) 悬尾实验: 通过悬尾实验确定不动时间。将大鼠悬挂在离地面 50 cm 的金属盒顶部,在离尾巴约 1 cm 处用胶带固定。实验持续时间为 6 min,记录最后 4 min 时大鼠不动时间 (大鼠被悬挂并保持完全不动)。

(3) 强迫游泳实验: 将大鼠分别置于 25 ℃ 的圆柱形 (高度: 50 cm, 直径: 30 cm) 水中, 水温为 (22±1) ℃, 水深 30~35 cm。强迫游泳 15 min 进行训练。训练 24 h 后, 再次将大鼠单独置于圆筒中 5 min (测试过程), 用秒表测量大鼠 5 min 内不动时间。不动时间为大鼠漂浮在水面上, 仅做有限的运动以保持头部露出水面。

**1.2.4 检测海马中神经递质水平** 行为学实验结束后处死大鼠, 冰上快速分离海马组织。然后制成组织匀浆液, 离心 (3 000 r/min、4 ℃) 10 min, 提取上清液。根据厂家的说明书, 使用 ELISA 试剂盒检测海马组织中单胺类神经递质 5-羟色胺 (5-HT) 和多巴胺 (DA) 水平。

**1.2.5 实时定量聚合酶链反应 (RT-qPCR)** 使用 TRIzol® 试剂从海马组织中分离总 RNA, 并使用 cDNA 合成试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。随后用实时荧光定量 PCR 试剂盒进行 PCR 反应, 以 U6 作为内部对照, 使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法检测 miR-137 的相对表达水平。miR-137 正向引物序列: 5'-GCGCGCTTAT TGCTTAAGAATAC-3', 反向引物序列: 5'-GTGCA GGGTCCGAGGT-3'; U6 正向引物序列: 5'-TGCGG GTGCTCGCTTCGGCAGC-3', 反向引物序列: 5'-CC AGTGCAGGGTCCGAGGT-3'。

**1.2.6 Western blotting 检测海马中 Iba-1、iNOS 和 Arg1 蛋白的表达** 采用放射免疫沉淀分析 (RIPA)

裂解和提取缓冲液提取组织总蛋白。BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。用 SDS-PAGE 分离等量的蛋白质并转移到聚偏二乙烯 (PVDF) 膜上。用 TBST 缓冲液洗涤后, 用脱脂牛奶将膜封闭。将膜与一抗于 4 ℃ 过夜孵育, 再与二抗孵育 2 h。最后使用 ChemiDoc MP 成像系统对条带进行可视化分析。

**1.2.7 检测海马中炎症因子 IL-1β、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-10 (IL-10) 的水平** 将大鼠海马组织在冰上迅速分离, 加入 RIPA 裂解物后, 研磨组织, 收集上清液。采用 ELISA 试剂盒检测海马组织匀浆上清液中 IL-1β、IL-6、IL-4 和 IL-10 的水平。使用酶标仪测定在 450 nm 时每孔的吸光度 (A) 值。

**1.2.8 统计学方法** 本研究数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 并使用 SPSS 21.0 软件分析数据。采用 *t* 检验分析两组之间的差异, 单因素方差分析多组之间的显著差异。

## 2 结果

### 2.1 雷公藤甲素对大鼠抑郁样行为的影响

与对照组比较, 模型组大鼠的糖水偏好度显著降低, 悬尾和强迫游泳不动时间显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 雷公藤甲素组大鼠的糖水偏好度显著升高, 不动时间显著减少 ( $P < 0.05$ ); 与雷公藤甲素+NC 抑制剂组比较, 雷公藤甲素+miR-137 抑制剂组大鼠的糖水偏好度显著降低, 悬尾和强迫游泳不动时间显著增加 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 各组大鼠抑郁样行为的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison on depression-like behavior of rats in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                | n/只 | 糖水偏好度/%                     | 悬尾不动时间/s                      | 强迫游泳不动时间/s                  |
|-------------------|-----|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 对照                | 10  | 85.24±9.34                  | 49.15±3.15                    | 39.22±5.06                  |
| 模型                | 10  | 26.39±2.08*                 | 123.43±11.38*                 | 112.14±8.14*                |
| 雷公藤甲素             | 10  | 67.42±6.35 <sup>#</sup>     | 69.51±6.03 <sup>#</sup>       | 61.18±6.22 <sup>#</sup>     |
| 雷公藤甲素+NC 抑制剂      | 10  | 69.63±7.11                  | 65.27±7.26                    | 63.39±8.39                  |
| 雷公藤甲素+miR-137 抑制剂 | 10  | 35.12±3.06 <sup>&amp;</sup> | 109.19±10.41 <sup>&amp;</sup> | 96.43±7.18 <sup>&amp;</sup> |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与雷公藤甲素+NC 抑制剂组比较: <sup>&</sup> $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs triptolide+NC inhibitor group

### 2.2 雷公藤甲素对 CUS 抑郁大鼠海马 miR-137 表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠海马中 miR-137 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 雷公藤甲素组大鼠海马中 miR-137 表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与雷公藤甲素+NC 抑制剂组比较, 雷公藤甲素+miR-137 抑制剂组大鼠海马中 miR-137 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

### 2.3 雷公藤甲素对 CUS 抑郁大鼠海马 5-HT 和 DA 水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠海马中神经递质 5-HT 和 DA 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 雷公藤甲素组大鼠海马中 5-HT 和 DA 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与雷公藤甲素+NC inhibitor 组比较, 雷公藤甲素+miR-137 抑制剂组大鼠海马中 5-HT 和 DA 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 2 各组大鼠海马中 miR-137 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Comparison on expression of miR-137 in hippocampus of rats in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                | n/只 | miR-137 相对表达量              |
|-------------------|-----|----------------------------|
| 对照                | 6   | 1.00±0.11                  |
| 模型                | 6   | 0.33±0.03*                 |
| 雷公藤甲素             | 6   | 0.84±0.08 <sup>#</sup>     |
| 雷公藤甲素+NC 抑制剂      | 6   | 0.82±0.07                  |
| 雷公藤甲素+miR-137 抑制剂 | 6   | 0.30±0.04 <sup>&amp;</sup> |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$ ; 与雷公藤甲素+NC 抑制剂组比较: <sup>&</sup> $P<0.05$

\* $P<0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P<0.05$  vs model group; <sup>&</sup> $P<0.05$  vs triptolide+NC inhibitor group

表 3 各组大鼠海马中神经递质水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Comparison on levels of neurotransmitters in the hippocampus of rats in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                | n/只 | 5-HT/(ng·mg <sup>-1</sup> ) | DA/(ng·mg <sup>-1</sup> )   |
|-------------------|-----|-----------------------------|-----------------------------|
| 对照                | 3   | 68.16±4.14                  | 186.24±12.22                |
| 模型                | 3   | 26.28±2.76*                 | 64.39±6.41*                 |
| 雷公藤甲素             | 3   | 61.37±5.58 <sup>#</sup>     | 162.44±13.17 <sup>#</sup>   |
| 雷公藤甲素+NC 抑制剂      | 3   | 58.44±5.23                  | 156.57±14.35                |
| 雷公藤甲素+miR-137 抑制剂 | 3   | 32.52±2.45 <sup>&amp;</sup> | 75.19±9.84 <sup>&amp;</sup> |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$ ; 与雷公藤甲素+NC 抑制剂组比较: <sup>&</sup> $P<0.05$

\* $P<0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P<0.05$  vs model group; <sup>&</sup> $P<0.05$  vs triptolide+NC inhibitor group

## 2.4 雷公藤甲素对 CUS 抑郁大鼠海马小胶质细胞活化的影响

与对照组比较, 模型组大鼠海马 Iba-1 蛋白表达显著升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 雷公藤甲素组大鼠海马 Iba-1 蛋白表达显著降低 ( $P<0.05$ ); 与雷公藤甲素+NC 抑制剂组比较, 雷公藤甲素+

miR-137 抑制剂组大鼠海马 Iba-1 蛋白表达显著升高 ( $P<0.05$ ), 见图 1、表 4。

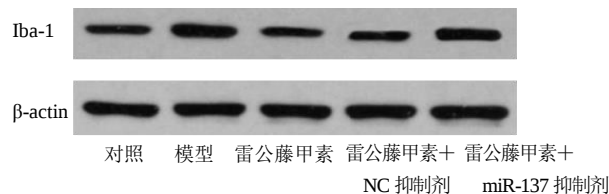


图 1 各组大鼠海马中 Iba-1 蛋白的表达

Fig. 1 Expression of Iba-1 protein in hippocampus of rats in each group

表 4 各组大鼠海马中 Iba-1 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 4 Comparison on relative expression of Iba-1 protein in hippocampus of rats in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                | n/只 | Iba-1 蛋白相对表达水平             |
|-------------------|-----|----------------------------|
| 对照                | 3   | 1.00±0.10                  |
| 模型                | 3   | 3.51±0.31*                 |
| 雷公藤甲素             | 3   | 1.56±0.19 <sup>#</sup>     |
| 雷公藤甲素+NC 抑制剂      | 3   | 1.51±0.18                  |
| 雷公藤甲素+miR-137 抑制剂 | 3   | 3.10±0.35 <sup>&amp;</sup> |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$ ; 与雷公藤甲素+NC 抑制剂组比较: <sup>&</sup> $P<0.05$

\* $P<0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P<0.05$  vs model group; <sup>&</sup> $P<0.05$  vs triptolide+NC inhibitor group

## 2.5 雷公藤甲素对 CUS 抑郁大鼠海马炎症细胞因子水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠海马中促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平显著增加, 抗炎细胞因子 IL-4 和 IL-10 水平显著降低 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 雷公藤甲素组大鼠海马中 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平显著降低, IL-4 和 IL-10 水平显著升高 ( $P<0.05$ ); 与雷公藤甲素+NC 抑制剂组比较, 雷公藤甲素+miR-137 抑制剂组大鼠海马中 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平显著增加, IL-4 和 IL-10 水平显著降低 ( $P<0.05$ ), 见表 5。

表 5 各组大鼠海马炎症细胞因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Comparison on the levels of inflammatory cytokines in hippocampus of rats in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                | n/只 | IL-1 $\beta$ /(pg·mg <sup>-1</sup> ) | IL-6/(pg·mg <sup>-1</sup> ) | IL-4/(pg·mg <sup>-1</sup> )  | IL-10/(pg·mg <sup>-1</sup> )  |
|-------------------|-----|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 对照                | 3   | 32.15±2.73                           | 24.36±3.03                  | 211.31±18.63                 | 252.17±5.35                   |
| 模型                | 3   | 68.22±5.36*                          | 74.51±6.41*                 | 110.29±10.28*                | 121.46±8.06*                  |
| 雷公藤甲素             | 3   | 48.46±5.21 <sup>#</sup>              | 45.33±4.27 <sup>#</sup>     | 196.42±16.37 <sup>#</sup>    | 231.38±19.14 <sup>#</sup>     |
| 雷公藤甲素+NC 抑制剂      | 3   | 45.57±4.63                           | 42.48±3.86                  | 192.19±15.16                 | 228.59±17.13                  |
| 雷公藤甲素+miR-137 抑制剂 | 3   | 63.12±7.14 <sup>&amp;</sup>          | 65.22±5.38 <sup>&amp;</sup> | 127.43±9.34 <sup>&amp;</sup> | 136.43±15.21 <sup>&amp;</sup> |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$ ; 与雷公藤甲素+NC 抑制剂组比较: <sup>&</sup> $P<0.05$

\* $P<0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P<0.05$  vs model group; <sup>&</sup> $P<0.05$  vs triptolide+NC inhibitor group

## 2.6 雷公藤甲素对 CUS 抑郁大鼠海马小胶质细胞极化的影响

与对照组比较, 模型组大鼠海马 M1 型小胶质细胞标志物 iNOS 蛋白表达显著升高, M2 型小胶质细胞标志物 Arg1 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 雷公藤甲素组大鼠海马中 iNOS 蛋白表达显著降低, Arg1 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与雷公藤甲素+NC 抑制剂组比较, 雷公藤甲素+miR-137 抑制剂组大鼠海马中 iNOS 蛋白表达显著升高, Arg1 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2、表 6。

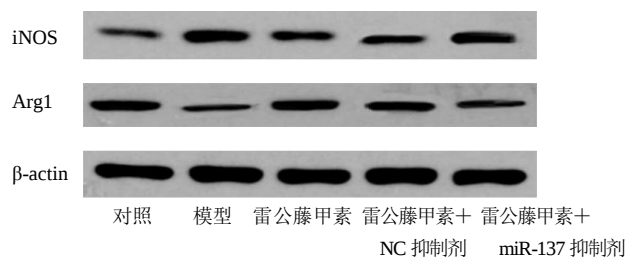


图 2 各组大鼠海马中 iNOS 和 Arg1 蛋白的表达

Fig. 2 expression of iNOS and Arg1 protein in hippocampus of rats in each group

表 6 各组大鼠海马中 iNOS 和 Arg1 蛋白相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Comparison on relative expressions of iNOS and Arg1 proteins in hippocampus of rats in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                | n/只 | 蛋白相对表达量                    |                            |
|-------------------|-----|----------------------------|----------------------------|
|                   |     | iNOS                       | Arg1                       |
| 对照                | 3   | 1.00±0.12                  | 1.00±0.08                  |
| 模型                | 3   | 3.81±0.31*                 | 0.35±0.05*                 |
| 雷公藤甲素             | 3   | 1.74±0.15 <sup>#</sup>     | 0.86±0.09 <sup>#</sup>     |
| 雷公藤甲素+NC 抑制剂      | 3   | 1.69±0.20                  | 0.84±0.08                  |
| 雷公藤甲素+miR-137 抑制剂 | 3   | 3.20±0.29 <sup>&amp;</sup> | 0.39±0.04 <sup>&amp;</sup> |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与雷公藤甲素+NC 抑制剂组比较: <sup>&</sup> $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs triptolide+NC inhibitor group

## 3 讨论

雷公藤甲素是从雷公藤中提取的活性成分, 具有较强的抗炎和免疫抑制活性, 可预防和治疗多种疾病<sup>[8-9]</sup>。众所周知, 雷公藤甲素在修复神经系统损伤中具有重要作用。如雷公藤甲素通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤<sup>[10]</sup>, 通

过促进自噬和抑制凋亡改善脊髓损伤<sup>[11]</sup>可以上调代谢性谷氨酸受体 5 抑制脂多糖诱导的帕金森病模型中的小胶质细胞活化<sup>[4]</sup>, 以及通过 CCL2/CCR2 轴调节小胶质细胞极化减轻神经病理性疼痛<sup>[12]</sup>。暴露于长期 CUS 的大鼠表现出明显的蔗糖偏好下降和不动时间增加, 这与之前的报道一致<sup>[13]</sup>。然而, 雷公藤甲素治疗减轻了 CUS 大鼠的抑郁样行为。这些数据表明, 雷公藤甲素对 CUS 大鼠有抗抑郁作用。

研究表明抑郁症患者的单胺类神经递质水平 (包括 5-HT、DA) 发生改变, 大多数经典抗抑郁药的作用部分归因于单胺类神经递质水平的升高<sup>[14]</sup>。海马是与抑郁症病理生理学相关的关键部位。据报道, CUS 抑郁大鼠模型中海马单胺 5-HT 和 DA 的水平下降<sup>[15]</sup>。本研究观察到在慢性应激的动物中, 海马中单胺类神经递质 5-HT 和 DA 水平显著降低。而雷公藤甲素处理对 CUS 引起的 5-HT 和 DA 水平的下降有明显的逆转作用。因此, 雷公藤甲素治疗可以减轻大鼠抑郁样行为, 这可能进一步归因于其对单胺类神经递质 5-HT 和 DA 水平的调控作用。

据报道, 抑郁症与小胶质细胞紊乱有关, 在抑郁症中也观察到小胶质细胞的异常活化。小胶质细胞活化程度与抑郁严重程度相关<sup>[16]</sup>。此外, 研究发现, 在中枢神经系统中, 活化的小胶质细胞在应对神经元损伤、免疫攻击和各种环境应激源时释放的促炎细胞因子可能是导致抑郁症的主要原因。这些细胞因子可通过抑制脑源性神经营养因子 (BDNF) 等生长因子的产生, 或抑制与异常神经传递相关的毒性代谢物的产生, 进而导致神经元损伤和丢失, 以及神经元脑功能的变性和减弱, 从而影响抑郁症<sup>[17]</sup>。因此, 抑制过度炎症反应可能成为抗抑郁的靶点。小胶质细胞活化是中枢神经系统固有免疫防御的内在组成部分, 在神经炎症反应中起关键作用。Iba-1 是小胶质细胞活化的特异性标志物<sup>[18]</sup>。因此, 本实验通过 Western blotting 检测大鼠海马 Iba-1 蛋白的表达水平, 发现模型组大鼠海马 Iba-1 蛋白表达显著升高, 而雷公藤甲素处理后 Iba-1 蛋白表达降低。这表明雷公藤甲素可改善 CUS 诱导的大鼠海马小胶质细胞活化。活化的小胶质细胞通常分为经典型 (M1) 和替代型 (M2)。M1 型小胶质细胞通过表达 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、iNOS 等促炎细胞因子参与神经营养系统功能障碍。M2 型被称为神经保护性小胶质细胞表型, 释放不同的介质, 包括 Arg1、IL-4 和 IL-10 来对抗炎症诱导的中枢神经系统损伤<sup>[19]</sup>。

本研究发现, CUS 大鼠海马中促炎细胞因子  $\text{IL-1}\beta$  和  $\text{IL-6}$  水平显著增加, 抗炎细胞因子  $\text{IL-4}$  和  $\text{IL-10}$  水平显著降低, M1 型小胶质细胞标志物 iNOS 蛋白表达显著升高, M2 型小胶质细胞标志物 Arg1 蛋白表达显著降低, 而雷公藤甲素处理后显著逆转这一结果。以上研究结果表明雷公藤甲素可通过调节小胶质细胞由 M1 向 M2 转化, 抑制促炎细胞因子释放, 促进抗炎细胞因子产生, 从而改善 CUS 诱导的抑郁样行为。

miRNA 是一类高度保守的非编码 RNA, 通过与靶 mRNA 的 3'-非翻译区直接结合在各种生物学过程中发挥调控作用<sup>[20]</sup>。在中枢神经系统疾病中, miRNA 是调节小胶质细胞增殖、分化和活化的重要调节因子<sup>[21]</sup>。近年来, 许多研究报道了 miRNA 在抑郁症中的重要作用。如 MiR-199a-5p 可靶向 WNT2, 通过调控环磷酸腺苷效应元件组合蛋白 (CREB)/BDNF 信号通路促进抑郁症的发生发展<sup>[22]</sup>。miR-137 主要作为抑癌基因, 通过转录因子、表观遗传改变和基因组改变等机制调控癌细胞的增殖、凋亡、血管生成、迁移、侵袭和分化<sup>[23]</sup>。有研究报道 miR-137 通过调控神经性分化 4 减轻炎症和氧化应激反应, 从而促进脊髓损伤的恢复<sup>[24]</sup>。此外, miR-137 表达异常与抑郁症的病因有关。Smalheiser 等<sup>[25]</sup>报道, 在有自杀行为的抑郁症患者死后的前额叶皮质中, miR-137 的表达水平显著下调。此外, Zhao 等<sup>[26]</sup>发现卒中后抑郁大鼠脑内 miR-137 水平显著降低, 外源性给予 miR-137 可以通过抑制 Grin2A 的表达改善其抑郁样行为。在本研究中, 我们发现 miR-137 在 CUS 抑郁大鼠的海马组织中表达显著下调, 而雷公藤甲素可以上调 miR-137 的表达。此外, 本研究进一步证明了雷公藤甲素通过上调 miR-137 抑制小胶质细胞的活化和炎性细胞因子的分泌。

综上所述, 雷公藤甲素通过上调 miR-137 调节海马小胶质细胞的极化从而减轻大鼠抑郁样行为, 为理解雷公藤甲素的抗抑郁作用以及抑郁症的机制提供了新的见解, 也为抑郁症的预防和治疗提供了潜在的靶点。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Beurel E, Toups M, Nemeroff C B. The bidirectional relationship of depression and inflammation: Double trouble [J]. *Neuron*, 2020, 107(2): 234-256.
- [2] Ganança L, Galfalvy H C, Cisneros-Trujillo S, et al.

- Relationships between inflammatory markers and suicide risk status in major depression [J]. *J Psychiatr Res*, 2021, 134: 192-199.
- [3] Peng Z X, Li X H, Li J, et al. Dlg1 knockout inhibits microglial activation and alleviates lipopolysaccharide-induced depression-like behavior in mice [J]. *Neurosci Bull*, 2021, 37(12): 1671-1682.
- [4] Huang Y Y, Zhang Q, Zhang J N, et al. Triptolide up-regulates metabotropic glutamate receptor 5 to inhibit microglia activation in the lipopolysaccharide-induced model of Parkinson's disease [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 71: 93-107.
- [5] Yan H L, Sun X W, Wang Z M, et al. MiR-137 deficiency causes anxiety-like behaviors in mice [J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 260.
- [6] Hu X F, Dong Y L, Jin X H, et al. The novel and potent anti-depressive action of triptolide and its influences on hippocampal neuroinflammation in a rat model of depression comorbidity of chronic pain [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 64: 180-194.
- [7] Xiao K, Luo Y M, Liang X, et al. Beneficial effects of running exercise on hippocampal microglia and neuroinflammation in chronic unpredictable stress-induced depression model rats [J]. *Transl Psychiatry*, 2021, 11(1): 461.
- [8] Tong L, Zhao Q F, Datan E, et al. Triptolide: reflections on two decades of research and prospects for the future [J]. *Nat Prod Rep*, 2021, 38(4): 843-860.
- [9] 范文强, 吕书龙, 马玲, 等. 雷公藤甲素治疗类风湿关节炎的作用机制及安全性分析 [J]. *中草药*, 2019, 50(16): 3866-3871.
- [10] Pan W Y, Xu Z M. Triptolide mediates Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway to reduce cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Folia Neuropathol*, 2020, 58(4): 324-333.
- [11] Zhu N, Ruan J W, Yang X M, et al. Triptolide improves spinal cord injury by promoting autophagy and inhibiting apoptosis [J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(3): 785-794.
- [12] Bao X B, Chen C, Yuan L Y. Triptolide attenuates neuropathic pain by regulating microglia polarization through the CCL2/CCR2 axis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 8985721.
- [13] Li W, Liu X, Qiao H. Downregulation of hippocampal SIRT6 activates AKT/CRMP2 signaling and ameliorates chronic stress-induced depression-like behavior in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(12): 1557-1567.
- [14] Li Y F. MCurrent hypothesis of monoamine (5-HT) - Glutamate/GABA long neural circuit: aiming for fast-onset antidepressant discovery [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 208:

- 107494.
- [15] Peng Z W, Xue F, Zhou C H, *et al.* Repetitive transcranial magnetic stimulation inhibits Sirt1/MAO-a signaling in the prefrontal cortex in a rat model of depression and cortex-derived astrocytes [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 442(1/2): 59-72.
- [16] Jia X N, Gao Z H, Hu H L. Microglia in depression: current perspectives [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(6): 911-925.
- [17] Wang H X, He Y, Sun Z L, *et al.* Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 132.
- [18] Cheng S Q, Zhang Y, Chen S Z, *et al.* LncRNA HOTAIR participates in microglia activation and inflammatory factor release by regulating the ubiquitination of MYD88 in traumatic brain injury [J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(1): 169-177.
- [19] Zhong Z Z, Chen A, Fa Z Q, *et al.* Adipose-derived stem cells modulate BV2 microglial M1/M2 polarization by producing GDNF [J]. *Stem Cells Dev*, 2020, 29(11): 714-727.
- [20] Pu M F, Chen J, Tao Z T, *et al.* Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(3): 441-451.
- [21] Martin N A, Hyrlov K H, Elkjaer M L, *et al.* Absence of miRNA-146a differentially alters microglia function and proteome [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1110.
- [22] Liu Z, Yang J L, Fang Q, *et al.* MiRNA-199a-5p targets WNT2 to regulate depression through the CREB/BDNF signaling in hippocampal neuron [J]. *Brain Behav*, 2021, 11(8): e02107.
- [23] Wang Y J, Chen R L, Zhou X, *et al.* MiR-137: A novel therapeutic target for human glioma [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 21: 614-622.
- [24] Dai J, Xu L J, Han G D, *et al.* MiR-137 attenuates spinal cord injury by modulating NEUROD4 through reducing inflammation and oxidative stress [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(7): 1884-1890.
- [25] Smalheiser N R, Lugli G, Rizavi H S, *et al.* MicroRNA expression is down-regulated and reorganized in prefrontal cortex of depressed suicide subjects [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33201.
- [26] Zhao L X, Li H Z, Guo R Y, *et al.* MiR-137, a new target for post-stroke depression? [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(26): 2441-2448.

[责任编辑 金玉洁]