

木犀草素调控JAK1/STAT3通路对抑郁症大鼠海马小胶质细胞极化的影响

马丹凤^{1,2}, 陈蕾¹, 张传香², 任卫琼^{1*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410000

2. 湖南省儿童医院, 湖南 长沙 410000

摘要: 目的 基于小胶质细胞的极化探讨木犀草素发挥抗抑郁活性的相关机制。方法 将72只雄性大鼠随机分为对照组, 模型组, ABT-494组(10 mg/kg, JAK1抑制剂), 木犀草素低、高剂量(30、60 mg/kg)组和木犀草素(60 mg/kg) + ABT-494(10 mg/kg)组, 每组12只。除对照组外, 其余组大鼠采用慢性不可预知性温和应激(CUMS)联合孤养复制抑郁大鼠模型。建模成功后ig相应剂量的药物进行干预, 1次/d, 连续28 d。分别于造模前1 d、造模结束后和给药结束后, 采用糖水偏好实验和强迫游泳实验对大鼠抑郁样行为进行评估; 免疫荧光双染法检测大鼠海马齿状回(DG)小胶质细胞中离子钙结合衔接分子-1(Iba-1)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达; ELISA检测海马组织炎症因子白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-4、IL-10的水平; Western blotting检测海马组织Janus激酶1(JAK1)/信号转导与转录激活因子3(STAT3)通路相关蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠体重、糖水偏好度、海马组织IL-4、IL-10水平显著降低, 强迫游泳时不动时间、海马DG区Iba-1/iNOS共表达的阳性细胞数、海马组织TNF- α 、IL-6水平和p-JAK1/JAK1、p-STAT3/STAT3比值显著增加($P < 0.05$); 与模型组比较, ABT-494组、木犀草素+ABT-494组和木犀草素低、高剂量组大鼠体重、糖水偏好度、海马组织IL-4、IL-10水平显著增加, 强迫游泳时不动时间、海马DG区Iba-1/iNOS共表达的阳性细胞数、海马组织TNF- α 、IL-6水平和p-JAK1/JAK1、p-STAT3/STAT3比值显著降低($P < 0.05$); 且木犀草素和ABT-494联合使用后作用优于两者单独应用。结论 木犀草素的抗抑郁作用可能与抑制JAK1/STAT3信号通路的激活, 进而抑制小胶质细胞向M1型活化有关。

关键词: 木犀草素; 抑郁症; 小胶质细胞极化; Janus激酶1/信号转导与转录激活因子3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)12-2587-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.12.009

Effect of luteolin on polarization of hippocampal microglia in depression rats by regulating JAK1/STAT3 pathway

MA Danfeng^{1,2}, CHEN Lei¹, ZHANG Chuanxiang², REN Weiqiong¹

1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410000, China

2. Hunan Children's Hospital, Changsha 410000, China

Abstract: Objective Based on the polarization of microglia, to explore the relevant mechanism of luteolin exerting antidepressant activity. **Methods** Seventy-two male rats were randomly divided into control group, model group, ABT-494 group (10 mg/kg), luteolin low (30 mg/kg), high (60 mg/kg) dose groups, luteolin (60 mg/kg) + ABT-494 (10 mg/kg) group, 12 rats in each group. Except for control group, rats in the other groups were treated with chronic unpredictable mild stress (CUMS) combined with orphan rearing to replicate depression rat models. After the modeling was successful, the corresponding dose of drugs was given to the stomach for intervention, once a day, for 28 consecutive days. On one day before modeling, after modeling, and after drug administration respectively, sugar water preference experiment and forced swimming experiment were used to evaluate the depressive behavior of rats; immunofluorescence double staining method was used to detect the expression of Iba-1 and iNOS in rat hippocampal dentate gyrus (DG) microglia; ELISA was used to detect the levels of inflammatory factors interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-4 and IL-10 in hippocampus; Western blotting was used to detect the expression of Janus kinase 1

收稿日期: 2021-07-31

基金项目: 湖南省中医药科研计划项目(2021072); 湖南省教育厅科学研究项目(19C1415); 湖南省卫生健康委科研项目(20200312)

第一作者: 马丹凤(1984—), 女, 本科, 主管药师, 主要从事中药药理研究。Tel: (0731)85600987

*通信作者: 任卫琼(1975—), 女, 博士, 主要从事中药药理研究。Tel: (0731)85600362 E-mail: 1164096993@qq.com

(JAK1)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway related proteins in hippocampus. **Results** Compared with control group, the body weight, sugar water preference, and the levels of hippocampal IL-4 and IL-10 reduced significantly in the model group, the immobility time during forced swimming, the number of positive cells co-expressed with ionized calcium-binding adapter molecule-1 (Iba-1)/inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the hippocampal DG area, and the levels of TNF- α and IL-6 in hippocampus and the ratios of p-JAK1/JAK1 and p-STAT3/STAT3 increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the body weight, sugar water preference, and the levels of hippocampal IL-4 and IL-10 increased significantly in the luteolin low and high dose groups, the immobility time during forced swimming, the number of positive cells co-expressed with Iba-1/iNOS in the hippocampal DG area, the levels of TNF- α and IL-6 in hippocampus and the ratios of p-JAK1/JAK1 and p-STAT3/STAT3 reduced significantly ($P < 0.05$). In addition, the combined use of luteolin and JAK1 inhibitor ABT-494 could inhibit the JAK1/STAT3 signaling pathway and improve depression-like behavior in model rats better than the two alone. **Conclusion** The antidepressant effect of luteolin may be related to the inhibition of the activation of JAK1/STAT3 signaling pathway and the inhibition of the activation of microglia to M1 type.

Key words: luteolin; depression; microglia polarization; Janus kinase 1/signal transducer and activator of transcription 3

抑郁症是一种严重的危及生命的精神疾病,其特征是情绪变化和高自杀率,困扰着世界上很大一部分人口。越来越多的研究表明,抑郁症涉及大脑不同类型的细胞功能障碍,小胶质细胞作为主要的免疫细胞,在抑郁症的发生和发展中起着重要作用^[1]。小胶质细胞对应激引发的神经炎症有反应,通过释放促炎细胞因子及其代谢产物,调节神经元和星形胶质细胞的功能,调节抑郁^[2]。小胶质细胞介导的神经炎症参与抑郁症病理过程的发现为新型抗抑郁药的开发提供了策略。

木犀草素属于黄酮类成分,是一种重要的天然多酚,存在于多种植物中,具有强大的抗炎、抗氧化、抗癌和细胞保护作用^[3-4]。研究发现木犀草素具有抗抑郁活性,还能抑制小胶质细胞和星形胶质细胞的激活以及改善神经炎症疾病的严重程度^[5-8]。然而木犀草素的抗抑郁活性是否与小胶质细胞有关,还未见报道。Janus激酶(Janus kinase, JAK)/信号转导与转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)信号通路是一种多效细胞级联,可能参与抑郁症的病理生理学过程,并且抑制特定的JAK/STAT通路可能是一种有前途的治疗抑郁症新思路^[9-10]。JAK1/STAT3是调控小胶质细胞极化的重要信号通路^[11-12],抑制JAK1/STAT3的磷酸化,可抑制小胶质细胞异常活化介导的神经炎症和神经源性损伤,减轻抑郁样行为^[13-14]。因此,本研究拟从小胶质细胞活化的角度,探讨木犀草素发挥抗抑郁活性的相关机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级Wistar雄性大鼠72只,体质量(200±20)g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物

生产许可证号为SCXK(湘)2019-0004。饲养在湿度为35%~40%、温度为20~23℃的环境中,并保持12h的明暗循环,大鼠可随意获取水和食物。实验遵守《实验动物的护理和使用指南》的指导原则,实验动物按照3R原则给予人道关怀。

1.2 药品与主要试剂

木犀草素(成都瑞芬思生物科技有限公司,货号M-007,质量分数>98%);Upadacitinib[ABT-494,是一种高效的、具有口服活性的Janus激酶1(JAK1)抑制剂,质量分数99.96%,货号HY-19569,美国MedChemExpress公司];大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α ,货号ml002859)、白细胞介素-6(IL-6,货号ml102828)、IL-4(货号ml102825)、IL-10(货号ml002813)ELISA试剂盒均购自上海酶联生物有限公司;兔抗离子钙结合衔接分子-1(Iba-1,货号ab178846)、小鼠抗诱导型一氧化氮合酶(iNOS,货号ab210823)、山羊抗兔IgG H&L(Alexa Fluor® 594,货号ab150080)、山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Fluor® 488,货号ab150113)均购自英国Abcam公司;RIPA裂解液(货号P0013B)和BCA试剂盒(货号P0012S)购自碧云天生物科技公司;兔源一抗JAK1(货号PA5-105265)、p-JAK1(货号PA5-104554)、STAT3(货号PA5-86074)、p-STAT3(货号PA5-17876)、GAPDH(货号PA1-16777)、二抗山羊抗兔IgG(H+L,辣根过氧化物酶标记,货号A32734)均购自Thermo Fisher Scientific公司。

1.3 主要仪器

iMark680多功能酶标仪、蛋白转膜装置购自美国Bio-Rad公司;强迫游泳实验装置购自成都泰盟软件有限公司;TCS SP2共聚焦显微镜购自德国Leica公司。

2 方法

2.1 大鼠抑郁模型的制备及分组

大鼠适应性饲养7 d后,随机分为对照组,模型组,ABT-494(10 mg/kg)组,木犀草素低、高(30、60 mg/kg)剂量组^[6],木犀草素(60 mg/kg)+ABT-494(10 mg/kg)组,每组12只。除对照组外,其余组大鼠采用慢性不可预知性温和应激(CUMS)联合孤养^[15]复制抑郁大鼠模型:采用10种不同的刺激,包括禁水(24 h)、食物剥夺(24 h)、光/暗循环逆转、热应激(40 °C、5 min)、冷水中游泳(4 °C、5 min)、笼子震动(15 min)、约束(2 h)、房间内的无线电噪音(12 h)、夹尾(止血钳在距离大鼠尾根部1 cm处夹尾持续2 min)、足底电击(电压36 mV、电流1 mA,电击1次/10 s,共电击10次)。这些应激以随机顺序每天执行1次(禁食和禁水不能连着进行),一共进行28 d。对照组大鼠不给予任何应激,群养28 d。实验过程中观察大鼠一般状态及体质量变化,并于造模前1 d和造模结束后(造模28 d),进行糖水偏好实验和强迫游泳实验,通过行为学指标观测判定造模是否成功。

第29天开始,各组ig给药,对照组和模型组ig等量的生理盐水,每天1次,共28 d。

2.2 大鼠抑郁样行为学评估

分别于造模前1 d、造模结束后和给药结束后,对大鼠进行行为学指标评价。

2.2.1 强迫游泳实验 将大鼠置于单个玻璃圆筒中(高46 cm,直径20 cm,水温23~25 °C,水深30 cm)游泳,记录5 min内大鼠处于不再挣扎、漂浮不动状态的总时间(即不动时间)。该实验模拟抑郁症患者核心症状之一“行为绝望”。

2.2.2 糖水偏好实验 将2个装有1%蔗糖的饮用水瓶同时放入动物笼中,训练动物适应含葡萄糖的饮用水24 h。禁食禁水8 h后,每只大鼠给予1瓶纯净水和1瓶含1%蔗糖的水,外观和体积一致。24 h后,分别测量剩余液体体积;计算每只动物的糖水偏好度,代表动物的快感行为程度。

糖水偏好度=蔗糖水消耗量/总液体消耗量

2.3 免疫荧光双染法检测大鼠海马(dentate gyrus, DG)小胶质细胞中Iba-1和iNOS的表达

行为学检测结束后,每组随机选取6只大鼠,深度麻醉处死后断头取脑,4%多聚甲醛中固定2 h,然后4 °C下在30%蔗糖中脱水过夜。OCT包埋,制备10 mm厚的冠状切片并放置在载玻片上。室温下用10%标准山羊血清封闭1 h后,将切片与一抗兔抗Iba1(1:500)、小鼠抗iNOS(1:500)一起孵

育,4 °C过夜。用PBS洗涤3次、每次5 min后,将切片暴露于二抗Alexa fluor 594山羊抗兔和Alexa fluor 488山羊抗小鼠(1:400)中,37 °C避光孵育1 h,洗去二抗,加含DAPI的抗荧光淬灭剂复染细胞核,封片;共聚焦显微镜用于捕获荧光图像,使用Image-Pro Plus 6.0测量阳性细胞数。

2.4 大鼠海马组织IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-10水平检测

每组随机选取6只大鼠,断头取脑,在冰上迅速剥离海马组织,分为2部分,一部分液氮速冻后-80 °C冰箱保存备用,另一部分按1:9的比例加入预冷的生理盐水,制备10%的组织匀浆,ELISA法检测海马组织IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10的水平。

2.5 Western blotting法检测JAK1/STAT3通路相关蛋白表达

取-80 °C冰箱保存的海马组织,置于冰板上并在含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液中匀浆,4 °C、12 000 $\times$ g下离心5 min,收集上清液。BCA法测定蛋白质浓度。取等量蛋白质样品在10% SDS-PAGE上进行电泳分离并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,然后在室温条件下用5%脱脂牛奶封闭1 h。接下来将膜与一抗(JAK1、p-JAK1、STAT3、p-STAT3、GAPDH,1:1 000)一起孵育,在4 °C冰箱过夜。次日,在TBST中洗涤3次后,加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:5 000)在室温下孵育1 h。ECL化学发光显色,扫描蛋白质条带,Image J软件用于定量条带强度。

2.6 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用SNK- q 检验。

3 结果

3.1 木犀草素对抑郁大鼠体质量及一般状态的影响

造模前,各组大鼠精神状态良好、反应迅速、毛色顺滑有光泽、较活跃;造模过程中,模型大鼠精神状态逐渐萎靡、毛色暗淡、反应迟钝、常蜷缩不动、自主活动减少,并在造模28 d时体质量较对照组显著降低($P < 0.05$);给药结束后,各给药组大鼠较模型组大鼠精神状态有不同程度地改善,自主活动增加;与模型组比较,ABT-494组、木犀草素+ABT-494组和木犀草素低、高剂量组大鼠体质量显著增加($P < 0.05$);与ABT-494组和木犀草素高剂量组比较,木犀草素+ABT-494组大鼠体质量显著增加($P <$

0.05)。结果见表1。

3.2 木犀草素对抑郁大鼠糖水偏好实验和强迫游泳实验行为学的影响

与对照组比较,造模28 d后,模型大鼠强迫游泳不动时间显著增加,糖水偏好度显著降低($P < 0.05$);给药结束后,与模型组比较,ABT-494组、木犀草素+ABT-494组和木犀草素低、高剂量组大鼠强迫游泳不动时间显著降低,糖水偏好度显著增加($P < 0.05$);与ABT-494组和木犀草素高剂量组比较,木犀草素+ABT-494组大鼠强迫游泳不动时间显著降低,糖水偏好度显著增加($P < 0.05$)。结果见表2。

3.3 木犀草素对抑郁大鼠海马 DG 区小胶质细胞活化的影响

与对照组比较,模型组大鼠海马 DG 区 Iba-1/iNOS 共表达的阳性细胞数显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,ABT-494组、木犀草素+ABT-494组和木犀草素低、高剂量组大鼠海马 DG 区 Iba-1/iNOS 共表达的阳性细胞数显著降低($P < 0.05$);与ABT-494组和木犀草素高剂量组比较,木犀草素+ABT-494组大

鼠 Iba-1/iNOS 共表达的阳性细胞数显著降低($P < 0.05$),见图1、表3。

3.4 木犀草素对抑郁大鼠海马组织 IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10 水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠海马组织 TNF- α 、IL-6 水平显著增加,IL-4、IL-10 水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,ABT-494组、木犀草素+ABT-494组和木犀草素低、高剂量组大鼠海马组织 TNF- α 、IL-6 水平显著降低,IL-4、IL-10 水平显著增加($P < 0.05$);与ABT-494组和木犀草素高剂量组比较,木犀草素+ABT-494组大鼠海马组织 TNF- α 、IL-6 水平显著降低,IL-4、IL-10 水平显著增加($P < 0.05$)。结果见表4。

3.5 木犀草素对抑郁大鼠海马组织 JAK1/STAT3 通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠海马组织 p-JAK1/JAK1、p-STAT3/STAT3 值显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,ABT-494组、木犀草素+ABT-494组和木犀草素低、高剂量组大鼠海马组织 p-JAK1/JAK1、p-STAT3/STAT3 值显著降低($P < 0.05$);与ABT-494

表1 各组大鼠的体重变化($\bar{x} \pm s, n=12$)
Table 1 Changes in body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体重/g		
		造模前	造模28 d	给药结束后
对照	—	200.19±15.46	301.45±29.62	375.89±38.52
模型	—	201.52±17.38	246.12±27.35*	256.72±27.93*
ABT-494	10	203.69±16.15	240.89±30.24*	294.66±30.21 [#]
木犀草素	30	201.32±15.04	243.35±29.78*	305.81±32.06 [#]
	60	198.57±16.22	245.01±26.56*	321.73±35.24 [#]
木犀草素+ABT-494	60+10	202.41±17.04	239.95±27.31*	349.40±37.85 ^{#△▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与ABT-494组比较: [△] $P < 0.05$; 与木犀草素60 mg·kg⁻¹组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs ABT-494 group; [▲] $P < 0.05$ vs luteolin 60 mg·kg⁻¹ group

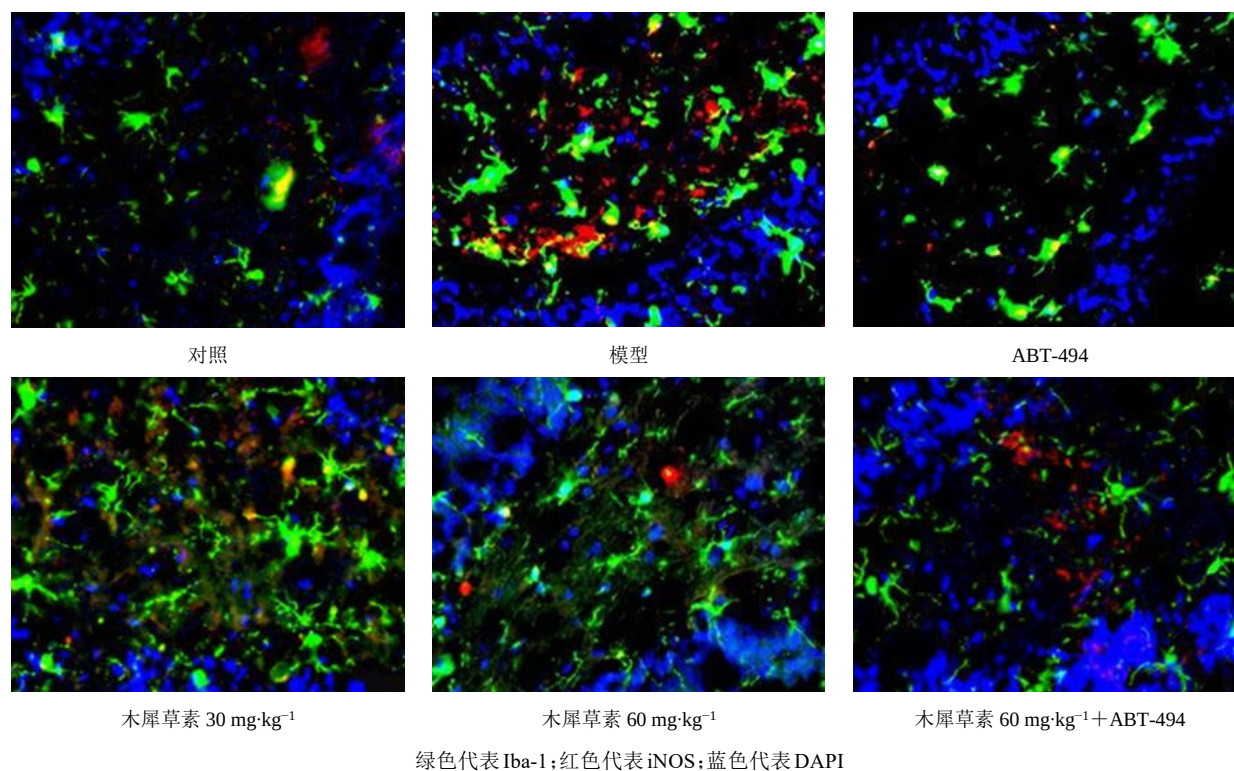
表2 各组大鼠强迫游泳时不动时间、糖水偏好度的变化($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 2 Changes of immobility time in forced swimming and sugar-water preference of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	强迫游泳不动时间/s			糖水偏好度/%		
		造模前	造模28 d	给药结束后	造模前	造模28 d	给药结束后
对照	—	35.46±3.74	34.86±4.59	32.25±4.01	75.34±8.61	76.25±8.30	74.18±7.96
模型	—	37.61±3.81	55.25±6.03*	69.34±7.22*	74.82±9.03	48.30±6.14*	33.05±4.62*
ABT-494	10	35.89±3.62	54.86±5.91*	54.76±6.11 [#]	79.15±8.49	45.72±7.68*	49.42±5.88 [#]
木犀草素	30	38.56±4.03	51.32±6.12*	58.42±6.20 [#]	77.26±8.15	46.81±6.59*	44.83±5.25 [#]
	60	36.85±3.90	53.47±6.25*	51.57±5.46 [#]	78.59±8.40	48.63±5.37*	52.27±5.76 [#]
木犀草素+ABT-494	60+10	35.74±3.78	55.39±6.07*	40.21±4.53 ^{#△▲}	75.34±8.26	43.99±5.61*	63.59±6.53 ^{#△▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与ABT-494组比较: [△] $P < 0.05$; 与木犀草素60 mg·kg⁻¹组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs ABT-494 group; [▲] $P < 0.05$ vs luteolin 60 mg·kg⁻¹ group



绿色代表 Iba-1; 红色代表 iNOS; 蓝色代表 DAPI
Green represents Iba-1; Red represents iNOS; Blue represents DAPI

图1 各组大鼠海马 DG 区小胶质细胞中 Iba-1 和 iNOS 的表达 (×400)

Fig. 1 Expression of Iba-1 and iNOS in microglia of hippocampus DG of rats in each group (×400)

表3 各组大鼠海马 DG 区小胶质细胞中 Iba-1 和 iNOS 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Expression of Iba-1 and iNOS in microglia of hippocampus DG of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Iba-1/iNOS
对照	—	6.25±1.03
模型	—	27.40±2.36*
ABT-494	10	18.72±2.19 [#]
木犀草素	30	20.81±2.45 [#]
	60	16.63±2.02 [#]
木犀草素+ABT-494	60+10	9.47±1.16 ^{#△▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与 ABT-494 组比较: [△] $P < 0.05$; 与木犀草素 60 mg·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs ABT-494 group; [▲] $P < 0.05$ vs luteolin 60 mg·kg⁻¹ group

表4 各组大鼠海马组织 IL-6、TNF-α、IL-4、IL-10 水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Levels of IL-6, TNF-α, IL-4, and IL-10 in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-6/(ng·g ⁻¹)	TNF-α/(ng·g ⁻¹)	IL-4/(ng·g ⁻¹)	IL-10/(ng·g ⁻¹)
对照	—	14.38±1.75	23.69±2.58	28.47±2.06	146.38±16.45
模型	—	37.41±3.02*	51.74±4.02*	6.94±1.15*	87.97±14.58*
ABT-494	10	27.68±3.07 [#]	39.72±4.31 [#]	13.56±1.43 [#]	108.19±12.83 [#]
木犀草素	30	30.56±3.24 [#]	42.81±4.57 [#]	10.27±1.29 [#]	99.35±11.62 [#]
	60	25.49±2.83 [#]	36.63±4.12 [#]	14.10±1.65 [#]	113.24±13.19 [#]
木犀草素+ABT-494	60+10	19.30±2.15 ^{#△▲}	29.36±3.25 ^{#△▲}	21.38±1.72 ^{#△▲}	125.76±15.26 ^{#△▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与 ABT-494 组比较: [△] $P < 0.05$; 与木犀草素 60 mg·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs ABT-494 group; [▲] $P < 0.05$ vs luteolin 60 mg·kg⁻¹ group

组和木犀草素高剂量组比较, 木犀草素+ABT-494 组大鼠海马组织 p-JAK1/JAK1、p-STAT3/STAT3 值显著降低 ($P < 0.05$)。结果见图2、表5。

4 讨论

成年哺乳动物中枢神经系统的再生主要发生于海马 DG 的颗粒下层, 虽然其主要负责学习与认知功能的调节, 但研究发现其也参与情绪相关的调节^[16]。如 Wisłowska-Stanek 等^[17]发现慢性束缚应激可减弱海马 DG 区中促肾上腺皮质激素释放因子的表达, 从而调节应激反应, 并诱导快感缺失和抑郁样症状; Rooney 等^[18]发现, 在高特质焦虑小鼠的海马 DG 区可见增强的 Iba1 阳性小胶质细胞密度, 使用米诺环素可通过调节 DG 区小胶质细胞的活性减

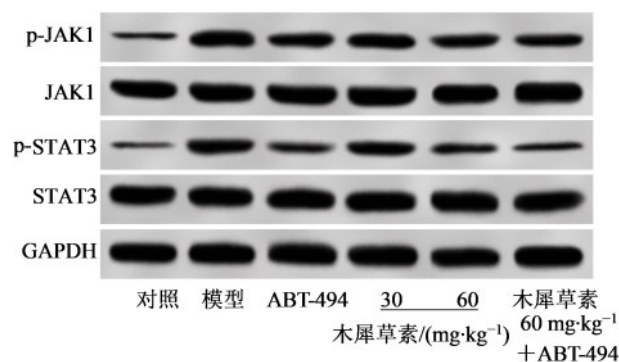


图2 各组大鼠海马组织 JAK1/STAT3 通路相关蛋白表达
Fig. 2 Expression of JAK1/STAT3 pathway related proteins in hippocampus of rats in each group

表5 各组大鼠海马组织 JAK1/STAT3 通路相关蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Expression of JAK1/STAT3 pathway related proteins in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)			
组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	p-JAK1/JAK1	p-STAT3/STAT3
对照	—	0.29±0.05	0.12±0.02
模型	—	0.72±0.08*	0.53±0.06*
ABT-494	10	0.59±0.07 [#]	0.37±0.04 [#]
木犀草素	30	0.62±0.06 [#]	0.42±0.05 [#]
	60	0.51±0.07 [#]	0.35±0.05 [#]
木犀草素+ ABT-494	60+10	0.40±0.05 ^{#△▲}	0.24±0.03 ^{#△▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与 ABT-494 组比较: [△] $P < 0.05$; 与木犀草素 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs ABT-494 group; [▲] $P < 0.05$ vs luteolin 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group

轻高特质焦虑小鼠的过度焦虑症状。在正常生理状态下成年动物海马颗粒下层神经区的主要成分为分枝状小胶质细胞,在病理状态下小胶质细胞大量活化并产生多种促炎细胞因子(如 NO、IL-6、TNF- α 等),引起中枢神经系统的炎症反应,损伤神经元,导致抑郁症的发生^[19]。活化的小胶质细胞具有双重功能,即促炎(M1 型)和抗炎(M2 型)功能^[20]。研究发现,在抑郁模型大鼠中海马 DG 区小胶质细胞被激活并向 M1 型极化,抑制海马小胶质细胞 M1 极化可发挥抗炎作用,改善模型大鼠的焦虑抑郁样行为^[21-22]。Iba-1 为小胶质细胞的特异性标志物,iNOS 为小胶质细胞 M1 表型标志物,两者共标记的就是处于 M1 极化状态的小胶质细胞。本研究采用 CUMS 联合孤养的方法建立抑郁大鼠模型,通过强迫游泳和糖水偏好实验的行为学指标评估模型的建立情况,结果显示,模型大鼠表现出行

为绝望和快感缺失等临床抑郁患者所表现出的相关症状,免疫荧光双染显示模型大鼠海马 DG 区中 Iba-1 和 iNOS 共表达的阳性细胞增多,且海马组织中其下游炎症因子 IL-6、TNF- α 水平升高,IL-4、IL-10 水平降低,说明海马 DG 区中小胶质细胞被活化且主要被激活为 M1 型;与已有研究结果一致。因此,海马 DG 区小胶质细胞的极化在抑郁症中发挥重要作用。

据报道,木犀草素可触发小胶质细胞转录组的整体变化,抑制小胶质细胞促炎细胞因子的表达,导致独特的抗炎和神经保护表型,是开发用于治疗神经退行性疾病的免疫调节和神经保护疗法的有希望的候选者^[23]。木犀草素通过各种机制表现出神经保护作用^[8],据报道,木犀草素的抗抑郁活性与抑制内质网应激^[5]、改善氧化/抗氧化平衡^[6]以及海马神经发生和神经可塑性^[7]有关。但是其抗抑郁活性是否与小胶质细胞的极化有关还未见相关报道。因此,本研究对此展开了探讨,结果显示给予木犀草素干预后,模型大鼠的抑郁样行为明显得到缓解,海马 DG 区中 Iba-1 和 iNOS 共表达的阳性细胞减少,且 IL-6、TNF- α 水平降低,IL-4、IL-10 水平升高,且高剂量组改善作用优于低剂量组;说明木犀草素可抑制模型大鼠海马 DG 区小胶质细胞向 M1 型极化,丰富了木犀草素抗抑郁的作用机制。

JAK/STAT 信号通路是一种多效细胞级联,可转导多种信号,参与调节中枢神经系统的多种功能,包括神经发生、突触可塑性和小胶质细胞的激活,所有这些都与情绪障碍的病理生理学有关。此外,已有治疗方法的抗抑郁作用已被证明是由 JAK/STAT 相关性机制介导的^[24],因此,JAK/STAT 通路可能参与抑郁症的病理生理学。JAK 的磷酸化可能通过磷酸化 STAT3 上的酪氨酸 705 和丝氨酸 727 残基来调节 STAT3 的活性。本研究采用 Western blotting 检测了 JAK1、STAT3 及其磷酸化蛋白的表达情况,结果显示,模型大鼠海马组织中 p-JAK1/JAK1、p-STAT3/STAT3 增加,说明 JAK1/STAT3 通路被激活。研究发现抑制 JAK/STAT 信号通路中的磷酸化可调节小胶质细胞极化^[25]。先前的研究表明,小胶质细胞中 α -干扰素(IFN- α)诱导的 iNOS 上调与 JAK1/STAT3 信号通路的激活有关,会诱发临床抑郁症^[26]。在 LPS 激活的小胶质细胞中 JAK1 和 STAT3 的磷酸化蛋白上调,并伴随着促炎细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的表达增加和抗炎因子 IL-10 的降低^[27];使用 JAK 抑制剂,可降低 iNOS 以及小胶

质细胞中STAT3的激活^[13]。木犀草素可以改变巨噬细胞的M1/M2极化,通过下调p-STAT3发挥抗炎作用^[28];还可通过靶向抑制STAT3信号通路减弱LPS诱导的星形胶质细胞活化和细胞因子的产生发挥神经保护作用^[29]。鉴于此,推测木犀草素可能通过抑制JAK1/STAT3信号通路的激活抑制小胶质细胞向M1型极化。研究结果也显示,经木犀草素干预后,模型大鼠海马组织中p-JAK1/JAK1、p-STAT3/STAT3值降低,其表达趋势与应用JAK1抑制剂ABT-494一致,且两者联合使用后对模型大鼠JAK1/STAT3信号通路的抑制作用和抑郁样行为的改善作用优于单独应用,进一步验证了此推测。

木犀草素的抗抑郁作用可能与抑制JAK1/STAT3信号通路的激活,进而抑制小胶质细胞向M1型极化有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Troubat R, Barone P, Leman S, et al. Neuroinflammation and depression: A review [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 151-171.
- [2] Jia X N, Gao Z H, Hu H L. Microglia in depression: Current perspectives [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(6): 911-925.
- [3] Conti P, Caraffa A, Gallenga C E, et al. Powerful anti-inflammatory action of luteolin: Potential increase with IL-38 [J]. *Biofactors*, 2021, 47(2): 165-169.
- [4] 李小林, 徐玉英, 孙向珏, 等. 木犀草素增强顺铂诱导的人肺癌细胞A549凋亡作用 [J]. *中草药*, 2009, 40(3): 431-433.
Li X L, Xu Y Y, Sun X J, et al. Luteolin enhances cisplatin-induced apoptosis of human lung cancer cell A549 [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2009, 40(3): 431-433.
- [5] Ishisaka M, Kakefuda K, Yamauchi M, et al. Luteolin shows an antidepressant-like effect via suppressing endoplasmic reticulum stress [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(9): 1481-1486.
- [6] 刘毅, 蓝诺, 刘莉, 等. 木犀草素对慢性不可预知性温和应激所致小鼠抑郁的改善作用 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(6): 1382-1384.
Liu Y, Lan N, Liu L, et al. Improving effect of luteolin on depression induced by chronic unpredictable mild stress in mice [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2013, 24(6): 1382-1384.
- [7] Crupi R, Paterniti I, Ahmad A, et al. Effects of palmitoylethanolamide and luteolin in an animal model of anxiety/depression [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2013, 12(7): 989-1001.
- [8] Kempuraj D, Thangavel R, Kempuraj D D, et al. Neuroprotective effects of flavone luteolin in neuroinflammation and neurotrauma [J]. *Biofactors*, 2021, 47(2): 190-197.
- [9] Eyre H, Baune B T. Neuroplastic changes in depression: a role for the immune system [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2012, 37(9): 1397-1416.
- [10] Shariq A S, Brietzke E, Rosenblat J D, et al. Therapeutic potential of JAK/STAT pathway modulation in mood disorders [J]. *Rev Neurosci*, 2018, 30(1): 1-7.
- [11] Hong Q, Yang Y, Wang Z H, et al. Longxuetongluo capsule alleviates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation by regulating multiple signaling pathways in BV₂ microglia cells [J]. *J Chin Med Assoc*, 2020, 83(3): 255-265.
- [12] Kim O S, Park E J, Joe E H, et al. JAK-STAT signaling mediates gangliosides-induced inflammatory responses in brain microglial cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(43): 40594-40601.
- [13] Hao Y T, Yang X S, Chen C H, et al. STAT3 signalling pathway is involved in the activation of microglia induced by 2.45 GHz electromagnetic fields [J]. *Int J Radiat Biol*, 2010, 86(1): 27-36.
- [14] Zhang J Q, He H, Qiao Y, et al. Priming of microglia with IFN- γ impairs adult hippocampal neurogenesis and leads to depression-like behaviors and cognitive defects [J]. *Glia*, 2020, 68(12): 2674-2692.
- [15] 刘晓节, 郑兴宇, 李震宇, 等. 慢性温和不可预知应激抑郁模型大鼠脑组织¹H-NMR代谢组学研究 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(4): 612-621.
Liu X J, Zheng X Y, Li Z Y, et al. ¹H-NMR metabonomic study on brain tissues of chronic unpredicted mild stress model of depression in rats [J]. *Drug Eval Res*, 2019, 42(4): 612-621.
- [16] Carli M, Aringhieri S, Kolachalam S, et al. Is adult hippocampal neurogenesis really relevant for the treatment of psychiatric disorders? [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2021, 19(10): 1640-1660.
- [17] Wisłowska-Stanek A, Lehner M, Skórzewska A, et al. Behavioral effects and CRF expression in brain structures of high- and low-anxiety rats after chronic restraint stress [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 310: 26-35.
- [18] Rooney S, Sah A, Unger M S, et al. Neuroinflammatory alterations in trait anxiety: Modulatory effects of minocycline [J]. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1): 256-265.
- [19] Deng S L, Chen J G, Wang F. Microglia: A central player in depression [J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(3): 391-400.
- [20] Bernier L P, York E M, MacVicar B A.

- Immunometabolism in the brain: how metabolism shapes microglial function [J]. Trends Neurosci, 2020, 43(11): 854-869.
- [21] 杨皓然, 刘丽娜, 葛飞, 等. 基于海马小胶质细胞M1型极化研究逍遥散对OVX联合CUS焦虑抑郁模型大鼠的影响[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4964-4970.
- Yang H R, Liu L N, Ge F, et al. Effect of Xiaoyao San on OVX combined with CUS anxiety and depression model rats based on hippocampal microglia M1 polarization [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(20): 4964-4970.
- [22] Bassett B, Subramaniam S, Fan Y, et al. Minocycline alleviates depression-like symptoms by rescuing decrease in neurogenesis in dorsal hippocampus via blocking microglia activation/phagocytosis [J]. Brain Behav Immun, 2021, 91(1): 519-530.
- [23] Dirscherl K, Karlstetter M, Ebert S, et al. Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype [J]. J Neuroinflamm, 2010, 7(1): 3-18.
- [24] Al-Samhari M M, Al-Rasheed N M, Al-Rejaie S, et al. Possible involvement of the JAK/STAT signaling pathway in N-acetylcysteine-mediated antidepressant-like effects [J]. Exp Biol Med, 2016, 241(5): 509-518.
- [25] Qu Z, Zheng N, Wei Y Z, et al. Effect of cornel iridoid glycoside on microglia activation through suppression of the JAK/STAT signalling pathway [J]. J Neuroimmunol, 2019, 330(1): 96-107.
- [26] Lu D Y, Leung Y M, Su K P. Interferon- α induces nitric oxide synthase expression and haem oxygenase-1 down-regulation in microglia: implications of cellular mechanism of IFN- α -induced depression [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2013, 16(2): 433-444.
- [27] Cianciulli A, Dragone T, Calvello R, et al. IL-10 plays a pivotal role in anti-inflammatory effects of resveratrol in activated microglia cells [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 24(2): 369-376.
- [28] Wang S X, Cao M, Xu S H, et al. Luteolin alters macrophage polarization to inhibit inflammation [J]. Inflammation, 2020, 43(1): 95-108.
- [29] Che D N, Cho B O, Kim J S, et al. Luteolin and apigenin attenuate LPS-induced astrocyte activation and cytokine production by targeting MAPK, STAT3, and NF- κ B signaling pathways [J]. Inflammation, 2020, 43(5): 1716-1728.

[责任编辑 兰新新]