

异荛草苷调节小胶质细胞活化抑制内毒素血症小鼠神经炎症的研究

赵一静¹, 李银桂¹, 赵忠正², 易浪¹, 谭小琴¹, 李庆孝³, 董燕¹ (1. 广州中医药大学科技创新中心, 广东 广州 510405; 2. 东平县人民医院, 山东 泰安 271500; 3. 夏威夷大学, 美国 夏威夷檀香山 96822)

摘要: **目的** 研究异荛草苷(isoorientin, ISO)对内毒素血症小鼠神经炎症和小胶质细胞活化的干预作用及其对脑源性神经营养因子(BDNF)的影响。**方法** 将 BALB/c 小鼠随机分为 5 组: 空白对照组、脂多糖模型组($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 腹腔注射)、异荛草苷低剂量组($25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 灌胃)、异荛草苷高剂量组($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 灌胃)、氯化锂组($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 灌胃)。定量 RT-PCR 或 RT-PCR 法检测小鼠肝脏和脾脏中白细胞介素(IL)-1 β 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平以及脑皮质中诱导性一氧化氮合酶(iNOS)和精氨酸酶 1(Arg-1)、细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平。免疫荧光和蛋白印迹法检测皮质中离子钙结合衔接分子 1(Iba1)以及 BDNF 的表达水平。**结果** 异荛草苷可降低内毒素血症小鼠脾脏和肝脏中 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平($P < 0.05$), 同时异荛草苷还可减少脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 、Iba1、iNOS 和 Arg-1 的表达水平($P < 0.05$), 并且升高 BDNF 的表达($P < 0.05$)。**结论** 异荛草苷能抑制内毒素血症小鼠外周及脑内炎症, 通过抑制小胶质细胞活化、促进 BDNF 表达发挥神经保护作用。

关键词: 异荛草苷; 内毒素血症; 神经炎症; 小胶质细胞; 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)10-1452-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.10.006

Isorientin Regulates Microglia Activation to Inhibit Neuroinflammation in Endotoxemia Mice

ZHAO Yijing¹, LI Yingui¹, ZHAO Zhongzheng², YI Lang¹, TAN Xiaoqin¹, LI Qingxiao³, DONG Yan¹ (1. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Dongping County People's Hospital, Tai'an 271500 Shandong, China; 3. University of Hawaii, Honolulu 96822 Hawaii, USA)

Abstract: **Objective** To investigate the interventional effect of isoorientin (ISO) on neuroinflammation, microglia activation and BDNF in endotoxemia mice. **Methods** BALB/c mice were randomly divided into 5 groups: control group, LPS model group ($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip), isoorientin low dose group ($25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig), isoorientin high dose group ($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig), lithium chloride group ($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig). The levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor (TNF- α) in the liver and spleen, as well as the expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase-1 (Arg-1), cytokines TNF- α and IL-1 β in the cortex were measured by RT-qPCR or RT-PCR. Then, the expressions of Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the cortex were measured by immunofluorescence and Western Blotting. **Results** ISO treatment reduced the expression of IL-1 β and TNF- α in the spleen and liver of endotoxemia mice ($P < 0.05$). And ISO also reduced the expression of IL-1 β , TNF- α , Iba1, iNOS and Arg-1 in brain ($P < 0.05$), while it increased the expression of BDNF ($P < 0.05$). **Conclusion** ISO can inhibit peripheral and brain inflammation, inhibit microglia activation and increase BDNF to exert neuroprotective effects in endotoxemia mice.

Keywords: Isoorientin; endotoxemia; neuroinflammation; microglia; mice

收稿日期: 2021-05-08

作者简介: 赵一静, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药免疫药理。Email: 396140843@qq.com。通信作者: 董燕, 女, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向: 中药免疫药理。Email: dondy001@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973545)。

异荭草苷(isoorientin, ISO)属于黄酮类化合物,分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$, 可从玉米须、淡竹叶等中药材中提取,且广泛存在于败酱草、荞麦等食品中^[1-2]。异荭草苷具有抗氧化活性、镇痛或抗炎活性等多种生物学活性^[3-4]。目前已有研究^[4-5]报道了异荭草苷在角叉菜胶诱导的小鼠足肿胀模型、小鼠气囊炎症模型以及高脂饮食引起的肝氧化应激损害及肝炎中的抗炎作用。研究^[6]发现异荭草苷可通过 ATP 非竞争性机制特异性地抑制糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)。

GSK3 β 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,参与细胞生长和代谢,其过度活化参与神经损伤^[7-8],同时也参与炎症反应,促进炎症细胞因子白细胞介素(IL)-1, IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的产生^[9-11]。现已有研究^[7]发现异荭草苷能有效缓解阿尔茨海默病模型小鼠的记忆认知功能损伤,但关于异荭草苷抑制神经炎症的作用机制有待深入探讨。

内毒素血症表现为血液中或病灶内的细菌释放大量的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)进入血液,引起全身炎症的同时,还会破坏脑内稳态,引起神经炎症反应,神经炎症导致脑内免疫细胞过度激活并释放大炎症因子,影响突触可塑性、神经元功能等,从而引起学习记忆功能障碍^[12]。阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)、脑外伤等存在认知功能障碍的疾病多伴有神经炎症^[12]。

小胶质细胞是中枢神经系统炎症过程中的主要效应细胞,而钙离子接头蛋白-1(Ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba1)是其特异性标志物^[13],同时小胶质细胞还发挥释放神经营养因子促进神经元生长和迁移的生理作用^[14]。在不同环境中,小胶质细胞可活化为分泌促炎细胞因子的促炎性表型(M1)和分泌抗炎性细胞因子的抗炎性表型(M2)^[15]。诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)是 M1 型标志分子,精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)是 M2 型标志分子^[16]。过度激活的小胶质细胞会释放大炎症因子、氧自由基等,诱导神经元损伤甚至死亡,影响大脑学习记忆功能^[13]。

本研究观察异荭草苷对内毒素血症小鼠炎症反应及神经炎症的干预作用,并分析其对小胶质细胞活化和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的影响,研究中以 GSK3 β 抑制剂氯化锂(lithium chloride, LiCl)作为阳性对照。

1 材料与方法

1.1 动物 BALB/c 小鼠,雄性,SPF 级,6~8 周龄,体质量(22 $\pm$ 2)g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,动物质量合格证号:1103241911038772。饲养于广州中医药大学实验动物中心,使用许可证号为:SYXK(粤)2018-0001。实验经广州中医药大学动物伦理委员会批准,批准号:20190305043。

1.2 药物及试剂 异荭草苷,美国 Aldlab Chemicals 公司,批号:IS-170929;脂多糖、氯化锂,美国 Sigma 公司,批号:wh201703、213233;RIPA 裂解液,北京康为世纪生物科技有限公司,批号:01408/60441;BCA 蛋白定量试剂盒、小鼠单克隆抗体 GAPDH,北京全式金生物技术有限公司,批号:O10720、O11130;ECL 化学发光检测试剂盒,上海贝博生物科技有限公司,批号:BB20111;兔单克隆抗体 BDNF、驴抗山羊 IgG H&L (Alexa Fluor[®] 594),英国 Abcam 公司,批号:ab108319、ab150132;山羊多克隆抗体 Iba1,美国 NOVUS 公司,批号:NB100-1028;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、兔抗山羊 IgG、山羊抗兔 IgG,杭州联科生物科技有限公司,批号:3103944、A6126646、GAR0032;带有去除基因组功能的 Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒、SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix,日本东洋纺公司,批号:FSQ-301、QPK-201;DAPI 染色液,上海碧云天生物技术有限公司,批号:061819190819。

1.3 仪器 BSA224S 电子分析天平,德国 Sartorius 公司;Centrifuge 5424 R 小型高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;SCIENTZ-48 组织匀浆机,宁波新芝公司;800TS 吸收光检测仪,美国 Bio Te 公司;Powerpac universal 通用型电泳仪和 ChemiDoc XRS+ 多功能成像仪,美国 Bio-Rad 公司;超微量紫外分光光度计 NP80,德国 Implen 公司;ABI Applied Biosystems 2720 型热循环 PCR 仪和 7500 型实时荧光定量 PCR 仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;CM3050 S 冰冻切片机和 DMI8+DFC 7000T 荧光显微镜,德国 Leica 公司。

1.4 药物配制 脂多糖溶液、氯化锂溶液和异荭草苷高、低浓度溶液均用无菌生理盐水配制,4℃保存,1周内使用。

1.5 分组、模型复制及给药方法 所有 BALB/c 小鼠适应性喂养 5 d。将 30 只小鼠随机分为 5 组:空白对照组、脂多糖模型组、异荭草苷低剂量组、异荭

草苣高剂量组、氯化锂组，每组 6 只。空白对照组、脂多糖模型组，灌胃生理盐水；异荳蔻高、低剂量组分别给予 50、25 mg·kg⁻¹ 的异荳蔻溶液；氯化锂组给予 100 mg·kg⁻¹ 的氯化锂溶液，每日 1 次，连续灌胃 5 d。在末次给药 30 min 后，空白对照组腹腔注射生理盐水，脂多糖模型组和异荳蔻、氯化锂给药组腹腔注射 5 mg·kg⁻¹ 脂多糖，复制内毒素血症模型^[17]。小鼠以生存状态出现呼吸急促、毛发湿润并发黄、聚集成团、行动迟缓、稀便、眼睛分泌物增多等改变，且外周血、脑组织炎症因子水平升高为模型复制成功标准。腹腔注射 6 h 后，每组随机取 3 只小鼠，腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉，经左心室行主动脉插管，以 PBS 灌注冲洗，再以 4% 多聚甲醛灌注固定，断头、开颅取出完整的脑组织。置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后，更换 30% 的蔗糖脱水 2 d，待脑组织完全脱水后，进行 OCT 包埋，-80 ℃ 低温冰箱保存。各组其余 3 只小鼠颈椎脱臼处死，断头取脑，分离皮质，打开腹腔，分离肝脏、脾脏，置于 EP 管中，-80 ℃ 低温冰箱保存。

1.6 定量 RT-PCR(RT-qPCR)法检测肝脏和脾脏中 IL-1 β 、TNF- α 及脑皮质内 iNOS、Arg-1 的 mRNA 表达 从肝脏、脾脏和脑皮质中分离总 mRNA，并在分光光度计上对提取的总 RNA 的纯度和浓度进行测量。A260/A280 的比值在 1.8~2.2 之间。以带有去除基因组功能的 Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒，将 RNA 逆转录为 cDNA，然后使用 SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix 进行 Realtime PCR 反应。反应程序如下：95 ℃ 30 s 预变性，95 ℃ 5 s 变性，62 ℃ 30 s 退火/延伸，40 个循环。以 GAPDH 为内参，使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法进行数据分析。引物由上海生工生物工程公司合成，序列见表 1。

表 1 定量 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers used in quantitative PCR

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
GAPDH	Forward primer: TGTGTCCGTCGTCGATCTGA	150
	Reverse primer: TTGCTGTGAAGTCGCAGGAG	
IL-1 β	Forward primer: TCCAGGATGAGACATGAGCAC	105
	Reverse primer: GAACGTCACACACAGCAGGTTA	
TNF- α	Forward primer: CAGGCGGTGCCTATGTCTCA	199
	Reverse primer: GGCTACAGGCTTGCTACTCGAA	
iNOS	Forward primer: CAAGCACATTGGGAATGGAGA	136
	Reverse primer: CAGAACTGAGGTTACATGCTGGAG	
Arg-1	Forward primer: AGCTCTGGGAATCTGCATGG	125
	Reverse primer: ATGTACACGATGTCTTGGCAGATA	

1.7 RT-PCR 法检测脑皮质内 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达 从脑皮质中分离总 mRNA，根据第一链 cDNA 合成试剂盒说明书进行逆转录反应，以 GAPDH 为内参。反应程序如下：95 ℃ 5 min 预变性，95 ℃ 30 s 变性，58 ℃ 30 s 退火，72 ℃ 45 s 延伸，38 个循环，72 ℃ 10 min。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行分离。引物由上海生工生物工程公司合成，序列见表 2。

表 2 RT-PCR 引物序列

Table 2 Sequences of primers used in RT-PCR

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
GAPDH	Forward primer: TGTGTCCGTCGTCGATCTGA	150
	Reverse primer: TTGCTGTGAAGTCGCAGGAG	
IL-1 β	Forward primer: TGCAGAGTTCCTCACTGCTGATCA	388
	Reverse primer: GTGCTGCCTAATGTCTCCCTTG	
TNF- α	Forward primer: GATCTCAAAGACAACCACTAGTGTG	255
	Reverse primer: CTCCAGCTGGAAGACTCTCCACAG	

1.8 免疫荧光法检测脑组织中 Iba1 的表达 小鼠用水合氯醛腹腔注射麻醉后，心脏灌注冷的 PBS 和 4% 多聚甲醛对脑组织进行固定，后断头取脑，于 4% 多聚甲醛固定 48 h，30% 蔗糖脱水 24 h，后更换 30% 蔗糖溶液再脱水 24 h。脑组织 OCT 包埋后于冰冻切片机进行切片处理，厚度为 20 μ m。脑组织切片用 PBS 洗片 3 次后，用含有 0.01% TritonX-100 的 TBST 配制的 5% BSA 在湿盒中封闭 1 h，滴加一抗 4 ℃ 孵育 14~18 h。用 PBS 洗片 3 次后，滴加荧光二抗室温下避光孵育 30 min。PBS 洗片 3 次后，DAPI 孵育 5 min，再用 PBS 洗片 3 次。最后用 90% 甘油封片，于荧光显微镜下观察大脑皮质。

1.9 蛋白质印迹法检测脑皮质 Iba1 和 BDNF 的蛋白表达 采用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取脑皮质蛋白，BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，后加入适量的 5 $\times$ SDS 上样缓冲液，100 ℃ 变性 5 min。然后等量蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转至 PVDF 膜，5% 的 BSA 封闭 2 h 后加入相应的一抗(GAPDH 1:1 000, Iba1 1:100, BDNF 1:1 000)，4 ℃ 孵育过夜。再加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)，室温孵育 2 h。最后加入发光液后于多功能成像仪进行曝光拍照，统计灰度值计算相对表达量。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析，计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析方法，若方差齐则采用 SNK 法进

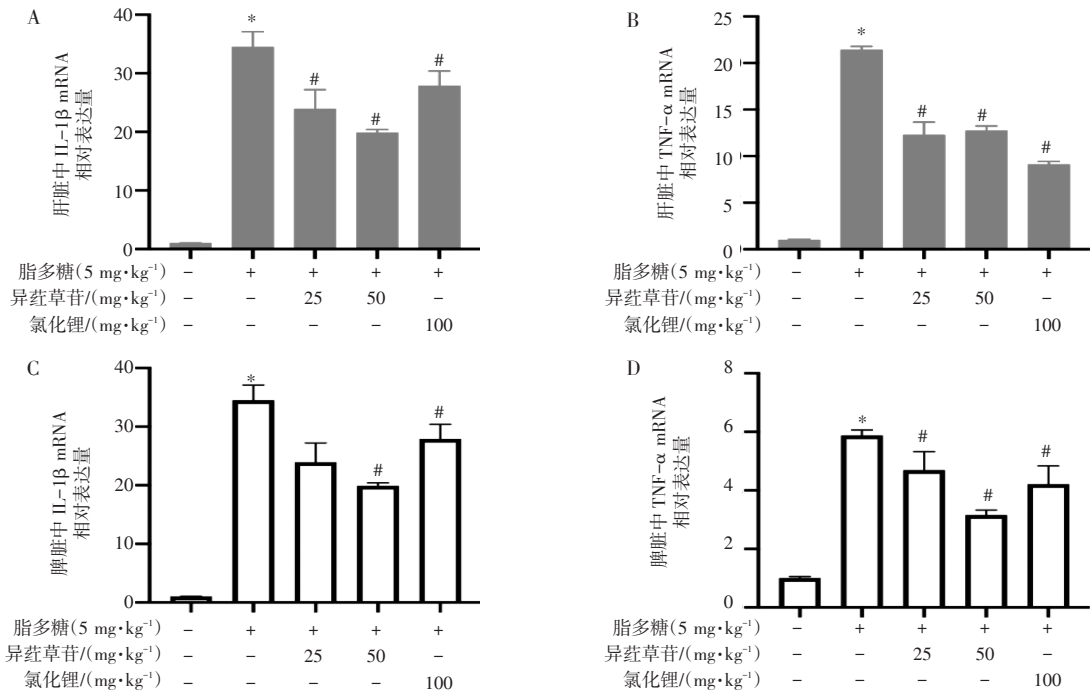
行两两比较,若方差不齐则采用 Dunnett's T3 法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 异荛草苷对内毒素血症小鼠肝脏和脾脏中 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达的影响

RT-qPCR 结果(图 1)显示,与空白对照组小鼠比较,脂多糖模型组小鼠

肝脏和脾脏中 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达增多($P < 0.05$);与模型组比,除了脾脏中异荛草苷低剂量组 IL-1 β 的差异无统计学意义(图 1-C),其他各组经过异荛草苷和氯化锂处理后,肝脏和脾脏中 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达均明显减少($P < 0.05$)。结果表明异荛草苷能降低内毒素血症小鼠外周组织中炎性细胞因子的 mRNA 表达水平。



注:与空白对照组比,* $P < 0.05$;与脂多糖模型组比,* $P < 0.05$

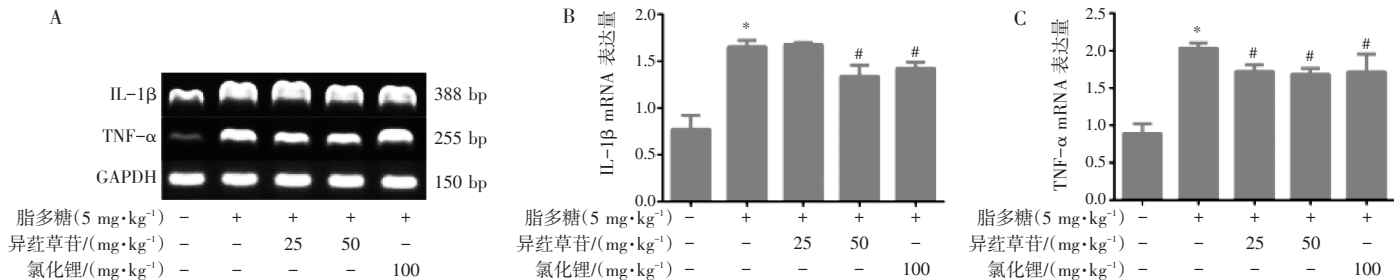
图 1 RT-qPCR 分析异荛草苷对肝脏和脾脏中 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 1 The effects of isoorientin on the mRNA expression of IL-1 β and TNF- α in liver and spleen were analyzed by RT-qPCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.2 异荛草苷对内毒素血症小鼠大脑皮质中 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达的影响

结果见图 2。脂多糖处理后小鼠大脑皮质中 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达增多($P < 0.05$);与模型组比,除了异荛草苷低剂量组 IL-1 β 的差异无统计学意义,其他各组给药后

IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达均明显降低($P < 0.05$)。结果表明,异荛草苷能降低内毒素血症小鼠脑组织中炎性细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达水平。



注:与空白对照组比,* $P < 0.05$;与脂多糖模型组比,* $P < 0.05$

图 2 RT-PCR 分析异荛草苷对脑皮质中 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

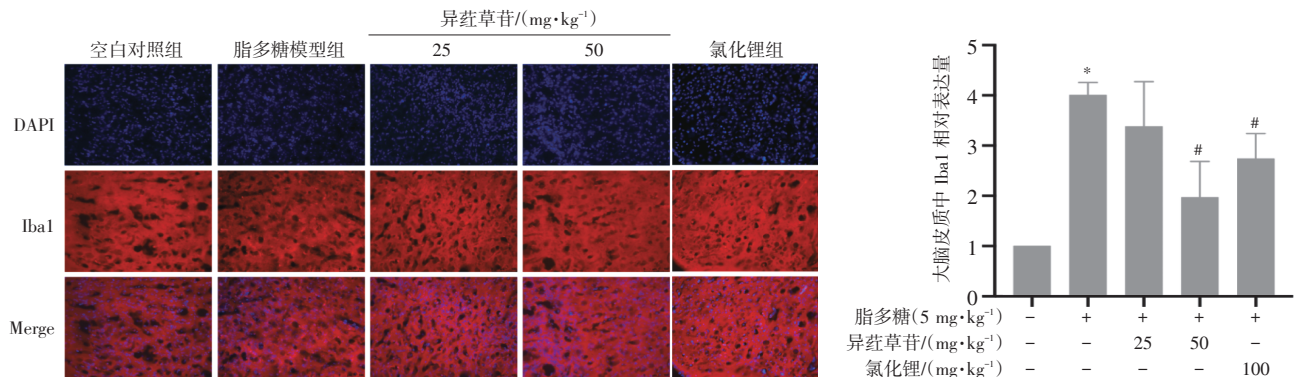
Figure 2 The effects of isoorientin on the mRNA expression of IL-1 β and TNF- α in cortex were analyzed by RT-PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3 异荛草苷对内毒素血症小鼠大脑皮质中 Iba1 蛋白表达的影响 免疫荧光检测结果(图 3)显示,脂多糖模型组小鼠大脑皮质中红色荧光标记的 Iba1 表达较空白对照组增加($P < 0.05$),高剂量异荛草苷和氯化锂处理后其表达明显降低($P < 0.05$),与蛋白质印迹法检测结果(图 4)一致。

2.4 异荛草苷对内毒素血症小鼠大脑皮质中 iNOS 和 Arg-1 mRNA 表达的影响 RT-qPCR 结果(表 3)显示,脂多糖处理可诱导小鼠大脑皮质中 iNOS 和 Arg-1 mRNA 表达增加($P < 0.05$),iNOS 的 mRNA 相对表

达倍数为(12.46 ± 5.15),而 Arg-1 则为(1.88 ± 0.19),提示小胶质细胞 M1 型激活明显强于 M2 型激活。而异荛草苷和氯化锂处理可明显下调内毒素血症小鼠大脑皮质中 iNOS 和 Arg-1 mRNA 的表达($P < 0.05$)。

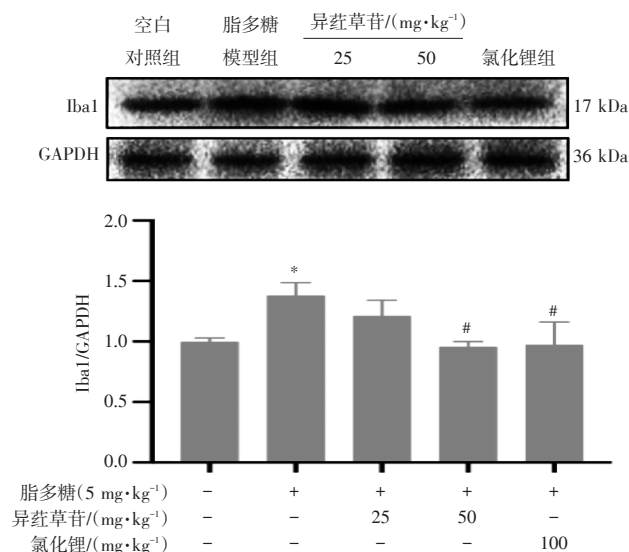
2.5 异荛草苷对内毒素血症小鼠大脑皮质中 BDNF 蛋白表达的影响 蛋白质印迹法结果显示,模型组大脑皮质中 BDNF 表达较空白对照组下调($P < 0.05$),给药后其表达明显上调($P < 0.05$),如图 5 所示。



注:与空白对照组比,* $P < 0.05$;与脂多糖模型组比,* $P < 0.05$

图 3 免疫荧光法($\times 200$)分析异荛草苷对大脑皮质中 Iba1 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 3 The effect of isoorientin on the expression of Iba1 in cortex was analysed by immunofluorescence($\times 200$)($\bar{x} \pm s, n=3$)



注:与空白对照组比,* $P < 0.05$;与脂多糖模型组比,* $P < 0.05$

图 4 蛋白印迹法分析异荛草苷对大脑皮质中 Iba1 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 4 The effect of isoorientin on the expression of Iba1 in cortex was analysed by Western Blot($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

已有一些研究表明脂多糖(LPS)等致炎物质可诱导小胶质细胞激活,导致神经退化,并引发许多神

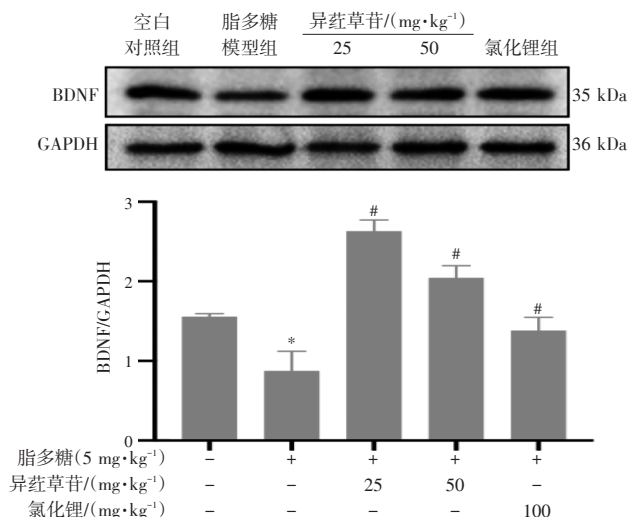
表 3 RT-qPCR 分析异荛草苷对大脑皮质中 iNOS 和 Arg-1 mRNA 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 The effects of isoorientin on the levels of iNOS and Arg-1 mRNA in cortex were detected by RT-qPCR($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	iNOS mRNA 相对表达量	Arg-1 mRNA 相对表达量
空白对照组	1.02 ± 0.27	1.02 ± 0.08
脂多糖模型组	12.46 ± 5.15*	1.88 ± 0.19*
异荛草苷低剂量组	5.89 ± 1.41#	0.87 ± 0.35*
异荛草苷高剂量组	7.59 ± 1.50#	0.92 ± 0.26*
氯化锂组	4.95 ± 0.50#	1.02 ± 0.34*

注:与空白对照组比,* $P < 0.05$;与脂多糖模型组比,* $P < 0.05$

经系统疾病,如阿尔茨海默病和帕金森病^[18]。本研究采用脂多糖腹腔注射复制小鼠内毒素血症模型,并在预实验中考察了 3 个脂多糖剂量(1.25、2.5、5 mg·kg⁻¹),以及不同时间点取材(1、6、18 h),分析外周炎症因子的变化及脑内病理改变,确定 5 mg·kg⁻¹的脂多糖剂量刺激 6 h 时外周及脑内神经炎症相关因子变化明显。并且小鼠在注射脂多糖 6 h 时出现呼吸急促、毛发湿润并发黄、小鼠聚集成团、行动迟缓、稀便、眼睛分泌物增多等症状,提示小鼠表现内毒素血症征象,故选择脂多糖 5 mg·kg⁻¹



注：与空白对照组比，* $P < 0.05$ ；与脂多糖模型组比，# $P < 0.05$

图 5 蛋白印迹法分析异荛草苷对大脑皮质中 BDNF 蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 5 The effect of isoorientin on the level of BDNF in cortex was analysed by Western Blot($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

腹腔注射、6 h 采样观察药物对神经炎症的干预作用。

小胶质细胞(MG)是中枢神经系统(CNS)的常驻免疫细胞,其表型和功能类似于巨噬细胞^[19]。小胶质细胞可被外来抗原或神经元碎片迅速激活,并产生多种细胞因子,促进炎症反应的发生和发展^[13]。活化的 M1 型小胶质细胞能够释放促炎细胞因子或介质,如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CCL2、活性氧(ROS)和一氧化氮(NO),且吞噬功能减弱^[20]。M2 型小胶质细胞具有产生抗炎和免疫抑制因子(包括 Arg-1、YM1 和 CD36)以及上调细胞表面标志 CD163、CD204 和 CD206 分子的表型,且吞噬功能增强^[21]。此外, M2 型激活的小胶质细胞具有分泌大量 BDNF、神经生长因子(NGF)的功能,而神经细胞也可合成 BDNF^[22]。BDNF 能促进神经细胞生长、发育和再生等过程,也能增强突触联系,调节神经细胞轴突、胞体,影响突触可塑性^[23-24]。而小胶质细胞的 M1 型过度激活则可能会加速某些中枢神经系统疾病的进程,其释放的细胞毒因子将引起神经元的进一步损伤^[13]。

本研究通过检测肝脏、脾脏以及脑皮质中的炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的水平,发现异荛草苷能有效降低肝脏、脾脏和脑皮质中的炎症因子表达水平,提示异荛草苷可有效减轻脂多糖刺激引起的外周炎症和神经炎症。进一步检测脑皮质中小胶质细胞活化标志物 Iba1、M1/M2 功能性标志物 iNOS 和 Arg-1,

以及神经营养因子 BDNF 的水平,发现 Iba1 表达增加, iNOS 升高倍数明显高于 Arg-1, 结果提示脂多糖刺激可导致脑内小胶质细胞激活, 且以 M1 型活化为主, 并且 BDNF 表达水平明显下降; 而异荛草苷可明显抑制 M1 型活化并明显升高 BDNF 水平, 提示异荛草苷能调节小胶质细胞活化、升高 BDNF, 发挥神经保护作用。

体外分子水平的研究显示异荛草苷是 GSK3 β 抑制剂^[6]。体外巨噬细胞和体内实验表明异荛草苷能增加 GSK3 β 的 9 位 Ser 磷酸化水平, 这是 GSK3 β 的活性抑制形式, 提示异荛草苷能抑制 GSK3 β 活性; 并且异荛草苷能调节巨噬细胞中 GSK3 β 下游信号分子的活化, 包括抑制 NF- κ B 和 ERK 的活化, 促进 Nrf2/HO-1 活化, 进而发挥抗炎抗氧化作用^[25]。而异荛草苷对神经炎症的调节作用与小胶质细胞活化的关系尚未明确。

综上所述, 异荛草苷能抑制内毒素血症小鼠外周及脑内炎症, 抑制小胶质细胞活化, 尤其能抑制 M1 型活化, 并升高脑内 BDNF 水平, 发挥神经保护作用。本研究为说明异荛草苷调节小胶质细胞活化抑制神经炎症进而发挥脑保护作用提供了实验依据, 为进一步研究异荛草苷用于治疗神经系统疾病提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] PENG J, FAN G, HONG Z, et al. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography[J]. J chromatogr A, 2005, 1074(1/2): 111-115.
- [2] WIDSTROM N W, SNOOK M E. A gene controlling biosynthesis of isoorientin, a compound in corn silks antibiotic to the corn earworm [J]. Entomologia Experimentalis Et Applicata, 1998, 89(2): 119-124.
- [3] FAN X Y, WEI W, HUANG J B, et al. Isoorientin attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity through the inhibition of oxidative stress and apoptosis via activating the SIRT1/SIRT6/Nrf-2 pathway[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 264.
- [4] KUPELI E, ASLAN M, GURBUZ I, et al. Evaluation of in vivo biological activity profile of isoorientin[J]. Z Naturforsch C, 2004, 59(11/12): 787-790.
- [5] YUAN L, HAN X, LI W, et al. Isoorientin prevents hyperlipidemia and liver injury by regulating lipid metabolism, antioxidant capability, and inflammatory cytokine release in high-fructose-fed mice[J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(13): 2682-2689.
- [6] LIANG Z, ZHANG B, SU W W, et al. C-Glycosylflavones alleviate tau phosphorylation and amyloid neurotoxicity through GSK3 β

- inhibition[J]. ACS Chem Neurosci, 2016, 7(7): 912–923.
- [7] TAN X Q, LIANG Z B, LI Y, et al. Isoorientin, a GSK-3 β inhibitor, rescues synaptic dysfunction, spatial memory deficits and attenuates pathological progression in APP/PS1 model mice[J]. Behav Brain Res, 2021, 398: 112968.
- [8] NEWCOMBE E A, CAMATS-PERNA J, SILVA M L, et al. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 276.
- [9] KINNEY J W, BEMILLER S M, MURTISHAW A S, et al. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement (N Y), 2018, 4: 575–590.
- [10] SPANGENBERG E E, GREEN K N. Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models[J]. Brain Behav Immun, 2017, 61: 1–11.
- [11] GREEN H F, NOLAN Y M. GSK-3 mediates the release of IL-1 β , TNF- α and IL-10 from cortical glia[J]. Neurochem Int, 2012, 61(5): 666–671.
- [12] BROWN G C. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16: 180.
- [13] XU L, HE D, BAI Y. Microglia-Mediated Inflammation and Neurodegenerative Disease[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53: 6709–6715.
- [14] CAO L, SU Z, ZHOU Q, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes olfactory ensheathing cells migration[J]. Glia, 2006, 54(6): 536–544.
- [15] ORIHUELA R, MCPHERSON C A, Harry G J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(4): 649–665.
- [16] CHERRY J D, OLSCHOWKA J A, O'BANION M K. Arginase 1+ microglia reduce A β plaque deposition during IL-1 β -dependent neuroinflammation[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 203.
- [17] LI J J, WANG B, KODALI M C, et al. In vivo evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15: 8.
- [18] CHAUDHRY H, ZHOU J, ZHONG Y, et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis[J]. In Vivo, 2013, 27(6): 669–684.
- [19] STREIT W J. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS[J]. Glia, 2002, 40(2): 133–139.
- [20] SAIJO K, GLASS C K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(11): 775–787.
- [21] MOSSER D M, EDWARDS J P. Exploring the full spectrum of macrophage activation[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(12): 958–969.
- [22] ZHAO H L, ALAM A, SAN C Y, et al. Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: recent developments[J]. Brain Res, 2017, 1665: 1–21.
- [23] BINDER D K, SCHARFMAN H E. Brain-derived neurotrophic factor[J]. Growth Factors, 2004, 22(3): 123–31.
- [24] Barde Y A. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons[J]. Prog Clin Biol Res, 1994, 390: 45–56.
- [25] LI Y G, ZHAO Y J, TAN X Q, et al. Isoorientin inhibits inflammation in macrophages and endotoxemia mice by regulating glycogen synthase kinase 3 β [J]. Mediators Inflamm, 2020, 2020: 8704146.

(编辑: 修春)