DOI:10.16016/j.2097-0927.202207029

柚皮苷改善脂多糖诱导的小鼠抑郁样行为的作用研究

吴 川,孔安琪,谢汝欣,李江辉,蔡 云,范晓棠 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):医学心理系军事认知心理学教研室

[**摘要**] **目的** 探究柚皮苷(naringin, Nar)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠抑郁样行为的影响。**方法** 将30只SPF级,体质量20~23 g的8周龄C57BL/6雄性小鼠分成3组(n=10):对照组、盐水+脂多糖组(Sal+LPS)、柚皮苷+脂多糖组(Nar+LPS)。后2组用柚皮苷进行预处理(80 mg/kg,腹腔注射,每天1次连续8 d)。用旷场实验、明暗箱实验、高架十字迷宫实验评价小鼠的探索行为和焦虑样行为;用糖水偏好实验、悬尾实验和强迫游泳实验来评价小鼠的抑郁样行为。采用Iba1免疫组化检测Nar和LPS处理对小鼠海马内小胶质细胞数量的影响;应用Western blot检测小鼠海马中NF-κB的蛋白表达水平;qRT-PCR检测小鼠海马内IL-1β、TNF-α和NF-κBmRNA的表达水平。**结果** 与对照组相比,Sal+LPS组小鼠糖水偏好降低(P<0.05),强迫游泳不动时间增加(P<0.01),悬尾静止时间增加(P<0.05);海马内小胶质细胞的数量增加(P<0.01);海马内NF-κB蛋白水平及IL-1β、TNF-α、NF-κB mRNA的表达水平增加。与Sal+LPS组小鼠相比,Nar+LPS组小鼠糖水偏好显著增加(P<0.01),强迫游泳不动时间减少(P<0.01),悬尾静止时间减少(P<0.05);海马内小胶质细胞的数量显著降低(P<0.01);海马内NF-κB蛋白水平及IL-1β、TNF-α、NF-κB mRNA的表达水平显著降低(P<0.01)。**结论** 柚皮苷可能通过抑制海马内的炎症反应改善脂多糖诱导的小鼠抑郁样行为。

[**关键词**] 抑郁症;柚皮苷;脂多糖;小鼠;NF-κB

[**中图法分类号**] R-332; R285.5; R749.4 [**文献标志码**] A

Naringin improves lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors in mice

WU Chuan, KONG Anqi, XIE Ruxin, LI Jianghui, CAI Yun, FAN Xiaotang Department of Military Cognitive Psychology, Faculty of Medical Psychology, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of naringin (Nar) on lipopolysaccharide (LPS)-induced depression-like behaviors in mice. **Methods** Thirty C57BL/6 male mice (8 weeks old, SPF grade, weighting 20~23 g) were randomly divided into 3 groups (n=10): control group, saline (Sal)+LPS group, and Nar+LPS group. The mice of the last group were pretreated with Nar (80 mg/kg, i.p., once a day for 8 consecutive days). The exploratory behavior and anxiety-like behavior in mice were assessed by open field test, light and dark box experiment and elevated plus maze test. Sugar water preference test, hanging tail test and forced swimming test were used to evaluate the depression-like behaviors of the mice. Immunohistochemical assay for Iba1 was adopted to detect the effects of Nar and LPS treatments on the number of microglia in the hippocampus of mice. Western blotting and qRT-PCR were performed to determine the protein expression of NF-κB and the mRNA levels of IL-1β, TNF-α and NF-κB in mouse hippocampus, respectively. **Results** As compared with the control group, the mice in the Sal+LPS group showed decreased preference for sugar water (P<0.05), and increased immobile time in the forced swimming test (P<0.01) as

[**基金项目**] 极端环境医学教育部重点实验室开放课题(KL2019GY003)

[**通信作者**] 范晓棠,E-mail:fanxiaotang2005@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

well as in the hanging tail test ($P<0.05$). The number of microglia in the hippocampus was elevated ($P<0.01$), the protein level of NF-κB and the mRNA levels of IL-1β, TNF-α and NF-κB were also up-regulated ($P<0.05$). When compared with the Sal+LPS group, the mice in the Nar+LPS group presented increased preference for sugar water ($P<0.01$), and decreased immobility time in the forced swimming test ($P<0.01$) and hanging tail test ($P<0.05$), with higher number of microglia in the hippocampus ($P<0.01$), and lower protein levels of NF-κB and mRNA levels of IL-1β, TNF-α and NF-κB ($P<0.01$). **Conclusion** Nar may ameliorate LPS-induced depression-like behaviors in mice by inhibiting inflammation in the hippocampus.

[**Key words**] depression; naringin; lipopolysaccharide; mice; NF-κB

Supported by the Open Topics in Key Laboratories of MOE for Extreme Environmental Medicine (KL2019GY003). Corresponding author: FAN Xiaotang, E-mail: fanxiaotang2005@163.com

抑郁症是一种常见的、易复发的精神疾病。临床上,抑郁症的特点是情绪或者心境低落、快感缺乏、睡眠不足、食物摄入和运动活动减少,并增加对疼痛的敏感性[1]。目前有不同的治疗措施,包括选择三环类抗抑郁药、选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRIs)、单胺氧化酶抑制剂、电休克治疗、运动、锂等用于抗抑郁治疗[2]。临床效果和长期结果仍不理想,一些抗抑郁药会使患者行为躁动,甚至会诱发自杀意念[3]。随着世界范围内抑郁症患者数量的快速增长,寻找新的分子靶点和治疗策略变得愈发重要。

柚皮苷(naringin, Nar)是一种天然存在的生物类黄酮,分布于较多种类的水果和蔬菜中,如葡萄和其他柑橘类水果,并负责水果的酸味和苦味。药代动力学研究表明,柚皮苷通过 α-鼠李糖苷酶和 β-葡萄糖苷酶进行肠杆菌酶代谢,去掉接在柚皮苷的 7 碳上两个鼠李糖单元,产生神经活性代谢物柚皮素[4-6]。柚皮素是容易吸收的主要活性糖苷成分,与蛋白激酶 C 信号传导途径相互作用的能力穿越血脑屏障,并引起广泛的神经保护功能[4]。在实验模型小鼠中发现,单次给药柚皮苷具有抗焦虑、抗抑郁样和增强记忆的特性,然而其中枢作用的途径目前仍不清楚。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性细菌的细胞壁成分。腹腔注射 LPS 引起中枢的神经炎症反应,包括白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1),白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis, TNF-α)在内的炎性细胞因子的升高,引起小鼠抑郁样行为和认知改变[7-8]。本研究采用 LPS 诱导的小鼠抑郁模型,检测 Nar 的抗抑郁作用。研究表明,柚皮苷具有很强的抗炎特性,能够抑制促炎细胞因子,如 IL-6 和 TNF-α 的表达[6, 8-9]。通过检测海马区域小胶质细胞数量和炎症相关因子的表达进一步探讨 Nar 对 LPS 诱导的抑郁样行为影响的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本实验采用 30 只 8 周龄雄性健康 C57BL/6 小鼠,SPF 级,体质量 20~23 g,小鼠 5 只/笼饲养,自由饮水和食物,环境温度为 21~24 ℃,相对湿度为 50%~60%,并维持 12 h 光照/12 h 黑暗的昼夜交替节律。所有行为学实验在陆军军医大学认知心理学教研室动物行为学实验室进行。所有的实验步骤都是经陆军军医大学批准按照实验动物指南进行护理和使用(Amuwec2020155)。

1.1.2 试剂与仪器 本实验采用的柚皮苷购于上海阿拉丁生物科技有限公司;脂多糖购于美国 Sigma 公司;柚皮苷溶于 0.9% 的生理盐水(saline, Sal)中(8 mg/mL);脂多糖溶于 0.9% 的生理盐水中(0.1 mg/mL);RIPA 裂解缓冲液(Beyotime, Shanghai, China);0.01M 磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH7.4);4% 多聚甲醛(PFA);冷冻保护剂溶液(30% 乙二醇,30% 蔗糖溶于 0.01M PBS);DAPI(1∶50 000)。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药方式 小鼠被随机分成 3 组:对照组、Sal+LPS 组、Nar+LPS 组,每组 10 只。①对照组:腹腔注射生理盐水,1 次/d,连续 13 d。②Sal+LPS 组:腹腔注射生理盐水,1 次/d,连续 8 d,之后腹腔注射 LPS,1 mg/kg,1 次/d,连续 5 d。③Nar+LPS 组:腹腔注射柚皮苷,80 mg/kg,1 次/d,连续 8 d[5],之后腹腔注射 LPS,1 mg/kg,1 次/d,连续 5 d[10]。柚皮苷和 LPS 用药剂量参考既往研究[5,10]。

1.2.2 行为学实验 所有的行为测试都是在最后一次 LPS 注射 12 h 后开始测试的。使小鼠适应实验每次测试前至少要放置 30 min。

1.2.3 旷场实验 将小鼠置于 40 cm×40 cm 大小的箱体内,将 40 cm×40 cm 划分成 4×4 个,共 16 块正方形区域,中间 2×2 的 4 块区域作为中心识别区,周

围的12块区域作为非中心识别区,用摄像头记录小鼠活动轨迹30 min[10,14-15],用Ethovision XT11.5软件进行分析。

1.2.4 蔗糖偏好实验(sucrose preference test,SPT) 将每只小鼠单独放在一个笼子内,给予两瓶1%的蔗糖水12 h适应,之后给予两瓶纯水12 h适应,再禁食水24 h,接着给予小鼠1瓶糖水和1瓶纯水饮用12 h,期间将糖水瓶和纯水瓶交换位置,以消除水瓶位置对小鼠喝水偏好的影响[14-15]。记录糖水瓶和纯水瓶前后质量差,即为小鼠12 h饮用的量。蔗糖偏好计算方法:

$$\text{蔗糖偏好} = \frac{\text{蔗糖水量}}{\text{蔗糖水量} + \text{纯水量}} \times 100\%$$

1.2.5 明暗箱穿梭实验 明箱大小30 cm×30 cm,内有灯光;暗箱大小30 cm×15 cm,内无灯光。两个箱体相连,中间有洞连通;两个箱体间有活动隔板。实验时将小鼠置于暗箱,录像时将中间的隔板打开,让小鼠可以自由穿梭于两个箱体。用摄像头监测小鼠的活动10 min,记录小鼠穿梭次数和在明箱时间[30]。

1.2.6 十字高架迷宫实验 小鼠由于嗜暗性会倾向于在闭臂中活动,但好奇心和探究性又会在开臂中活动,在面对新奇刺激时,小鼠产生探究的冲动与恐惧,造成了探究与回避的冲突行为,从而产生焦虑心理。十字高架迷宫实验使用灰色亚克力材质制成,尺寸大小为臂长425 mm×臂宽120 mm×臂高225 mm。调整实验环境光照为50 lx。将观察区域划分为开臂、闭臂和中心区。每只小鼠从中心区域放入并允许其在高架中自由探索10 min,测试箱正上方的摄像机监测小鼠活动情况[10]。用Ethovision XT 11.5软件记录小鼠期间的活动轨迹和停留于开臂和闭臂区域时间。

1.2.7 强迫游泳实验 每只小鼠都被放置了单独放入圆筒中(高度:20 cm,直径:10 cm)6 min,加水至10 cm高,水温25 ℃,以避免与温度有关压力反应。测定小鼠不动时间,记录小鼠在水中停止挣扎,缓慢移动以保持头部高于水面漂浮的时间。录制视频6 min,取后4 min记录并分析不动时间[10-11]。不动时间增加表示无助水平升高。

1.2.8 悬尾实验 小鼠被一个在声音和视觉上都隔离的钩子吊着,钩子离地面50 cm。钩子放在离尾巴尖约1 cm的地方。将小鼠被悬挂6 min,录制视频6 min,取后4 min记录并分析不动时间[10-11]。不动时间增加表示无助水平升高。

1.2.9 免疫组织化学和免疫荧光 用异氟烷深度麻醉小鼠,并用0.01 M磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH7.4)经心脏灌注4 min,然后用0.1 M磷酸盐缓冲液(PBS,pH7.4)和4%多聚甲醛(PFA)溶液灌注4 min。取出全脑,并在4℃下4%PFA固定剂中后固定2 d,然后在4 ℃下用30%蔗糖的4%PFA溶液固定3 d。在低温冰冻切片机器上切割连续的冠状脑切片(厚度30 μm)并在-20 ℃下在冷冻保护剂溶液(30%乙二醇,30%蔗糖溶于0.01 M PBS)中储存。首先将切片在0.01 M PBS中洗涤3×10 min以除去冷冻保护剂溶液,然后在37 ℃下在0.3%Triton X-100中处理2 h以增加膜的通透性,然后用0.01M PBS洗涤3×10 min。然后将切片与兔抗Iba1(1∶500,Wako,CA,USA)37 ℃孵育2 h,后4 ℃过夜。PBS洗涤后避光加兔抗Cy3(1∶500)二抗,37 ℃孵育2 h;之后PBS洗涤,加DAPI(1∶50 000)1 min,封片。最后,在配备有连接到Zeiss AxioVision 3.0系统的Zeiss Axiovert显微镜(Oberkochen,德国)下观察染色并拍照。每组有4只动物标本,每只动物至少取3张切片,取3次染色计数均值进行分析。

1.2.10 蛋白质印迹 分离海马样品并在冰冷的RIPA裂解缓冲液(Beyotime,Shanghai,China)中研磨匀浆。离心裂解物(15 000 r/min,4 ℃,10 min)后,使用二辛可宁酸试剂盒(Beyotime Institute of Biotechnology,Shanghai,China)测定蛋白质浓度。将蛋白质样品(每泳道10 μL)在10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶上于80 V分离120 min,然后以220 mA转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上120 min。在室温下用含有0.1% Tween 20和5%无脂牛奶的Tris缓冲盐水封闭3 h。然后将膜与针对NF-κB(1∶1 000,BD Biosciences)的兔抗体一起孵育,在4 ℃过夜,以及针对β-肌动蛋白的小鼠抗体(1∶2 000,Cell CWBIO,Beijing,China)。然后将膜在室温下与山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG;1∶2 000,Santa Cruz Biotechnology)一起室温孵育3 h。所有蛋白质印迹数据代表至少3次独立实验。通过增强化学发光方法(Amersham,Piscataway,NJ,USA)使膜上的特定蛋白质条带可视化。每组3只动物用于分析。

1.2.11 荧光定量PCR检测(real-time quantitative PCR,RT-qPCR) 分离海马样品并在4 ℃的TRIzol Reagent中研磨匀浆。加入200 μL的氯仿,震荡15 s,离心裂解物(12 000 r/min,4 ℃,10 min)后,取水相溶液加入200 μL的70%乙醇(无RNase水配置)混匀后加入吸附柱中。离心后用NanoDrop2000分光光度计测定RNA浓度。提取总mRNA(700 ng)并根据制造商的方案逆转录成cDNA。设计目的基因引物,配置反应体系,置于PCR仪反应。IL-1β引物序列:(F)5′-GGCAA-CTGTTCCTGAACTCAACTG-3′,(R)5′-CCATTGAGGT-GGAGAGCTTTCAGC-3′;TNF-α引物序列:(F)5-GTTTG-

GCTTCCGGTGTGTTG-3′,(R) 5′-GCATTGTGGGTCTT-GTTCCC-3′;NF-κB 引物序列:(F)5-ATGGCAGACG-ATGATCCCTAC-3′,(R)5′-CGGAATCGAAATCCCCTCT-GTT -3′。每组 3 只动物用于分析。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,小鼠体质量组内前后比较进行配对样本 t 检验,其余实验中因素比较进行单因素方差分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 柚皮苷的预处理可以减轻 LPS 对小鼠体质量的影响

LPS 处理使得小鼠的体质量有明显的下降,而柚皮苷的预处理可以逆转 LPS 对小鼠体质量的影响。根据实验进程测 4 次体质量:实验开始前(实验第 1 天);注射 8 d 的生理盐水或者柚皮苷后(实验第 8 天);注射 5 d 的 LPS 或生理盐水后(实验第 13 天),行为学检测完(实验第 18 天)。3 组小鼠为随机分组,每组小鼠的体质量进行组内前后对比。Sal+LPS 组体质量前后比较,给药的第 13 天和第 8 天相比,出现明显下降,同时与对照组相比,出现显著的统计学差异(图 1A,$P<0.01$);而 Nar+LPS 组体质量前后比较,给药的第 13 天和第 8 天相比,没有明显差异($P>0.05$);对照组体质量前后比较,第 13 天和第 8 天相比,体质量明显升高($P<0.05$)。

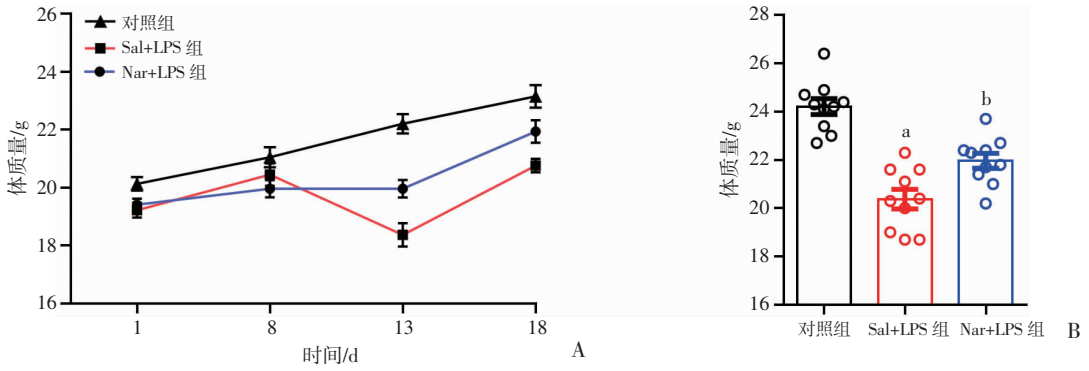
在实验第 13 天,3 组小鼠的体质量有明显差异(图 1B,$F=38.287$,$P<0.001$)。Sal+LPS 组体质量和对照组相比,明显下降($P<0.001$),Nar+LPS 组体质量和对照组相比,明显下降($P<0.001$),Sal+LPS 组体质量和 Nar+LPS 组相比,明显下降($P<0.01$)。说明 LPS 的处理可以明显降低小鼠的体质量,而 Nar 的预处理可以逆转 LPS 的影响。

2.2 柚皮苷和 LPS 不影响小鼠的探索行为和焦虑样行为

小鼠在 OFT 检测的总路程反映其探索行为,分时段路程统计显示 3 组小鼠无明显差异(图 2A、B),3 组小鼠在旷场总运路程亦无显著差异(图 2C,$F=0.049$),提示 LPS 和柚皮苷对小鼠的探索行为无明显影响。OFT 实验中心区域时间可以衡量小鼠焦虑程度,3 组小鼠在旷场中心区域时间的差异不明显(图 2D,$F=0.737$,$P>0.05$)。明暗箱实验和高架十字迷宫实验亦广泛用于评估小鼠的焦虑样行为,明暗箱实验结果显示 3 组小鼠在明暗箱穿梭次数(图 2E,$F=0.335$,$P>0.05$)和明箱时间(图 2F,$F=0.699$,$P>0.05$)差异均不显著;高架十字迷宫实验显示 3 组小鼠进入开臂次数百分比(图 2G,$F=1.735$,$P>0.05$);开臂时间(图 2H,$F=1.540$,$P>0.05$)差异均不显著。提示柚皮苷和 LPS 不影响小鼠的焦虑样行为。

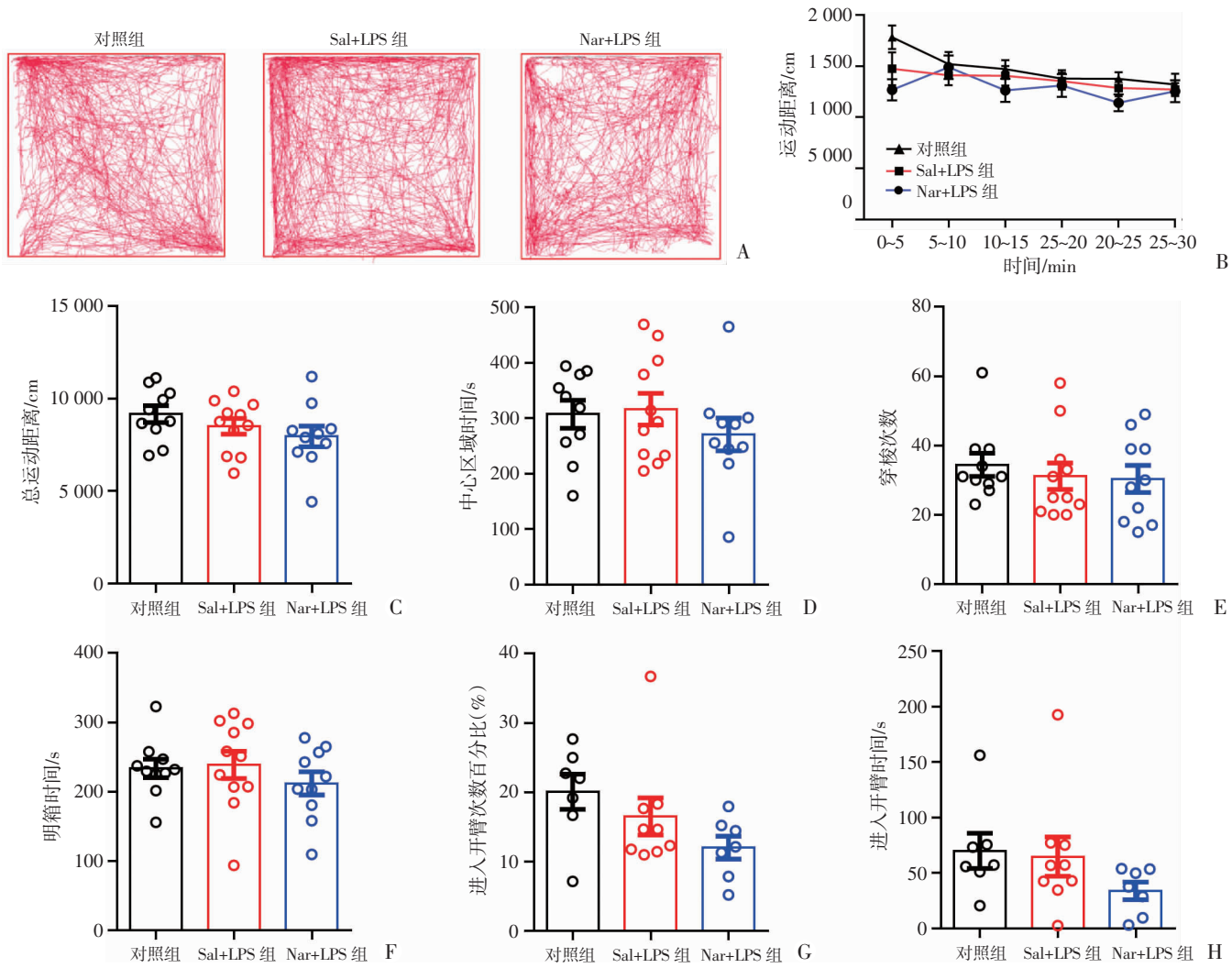
2.3 柚皮苷减轻 LPS 诱导小鼠的抑郁样行为

糖水偏好实验结果显示,3 组小鼠之间对糖水偏好程度有显著差异(图 3A,$F=3.936$,$P<0.05$),与对照组小鼠相比较,Sal+LPS 组小鼠对蔗糖的偏好减低($P<0.05$),Nar 处理可以改善 LPS 处理小鼠的蔗糖的偏好($P<0.05$)。悬尾实验结果显示,3 组小鼠之间在静止不动时间有显著差异(图 3B,$F=9.646$,$P<0.01$),与对照组小鼠相比较,Sal+LPS 组小鼠的静止不动时间显著增加($P<0.01$),而 Nar 处理可以减少 LPS 处理小鼠的静止不动时间($P<0.05$)。强迫游泳实验结果显示,3 组小鼠之间在静止不动时间有显著差异(图 3C,$F=22.033$,$P<0.01$),与对照组小鼠相比较,Sal+LPS 组小鼠的静止不动时间显著增加($P<0.01$),而 Nar 处理可以减少 LPS 处理小鼠的静止不动时间($P<0.01$). 以上结果提示柚皮苷减轻了 LPS 引起的小鼠抑郁样行为。



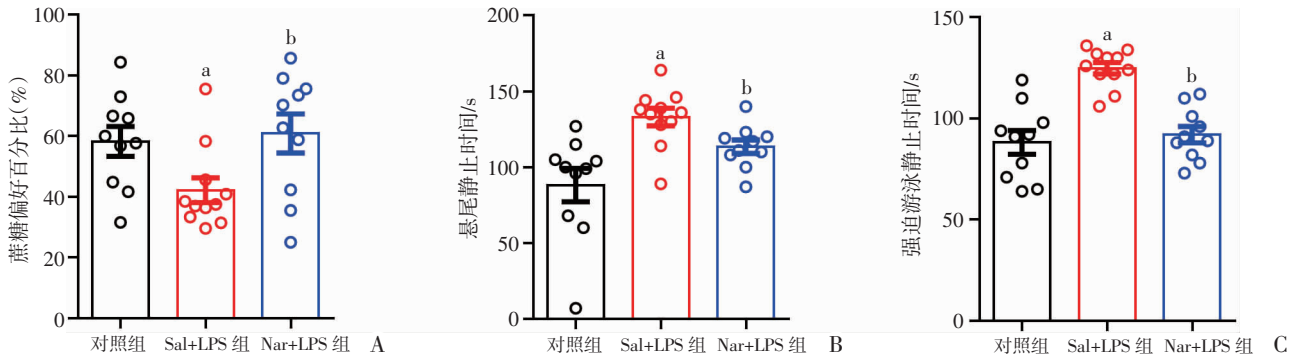
A:小鼠体质量变化情况;B:小鼠第 13 天的体质量情况 a:$P<0.01$,与对照组相比,b:$P<0.01$,与 Sal+LPS 组相比

图 1 Nar 和 LPS 小鼠的体质量



A:旷场实验小鼠运动轨迹图;B:3 组小鼠运动距离统计分析;C:3 组小鼠总运动距离;D:小鼠中心区域时间变化;E:小鼠穿梭次数统计;F:3 组小鼠明箱活动时间;G:3 组小鼠进入开臂次数百分比;H:3 组小鼠进入开臂时间统计

图 2 小鼠探索行为和焦虑样行为

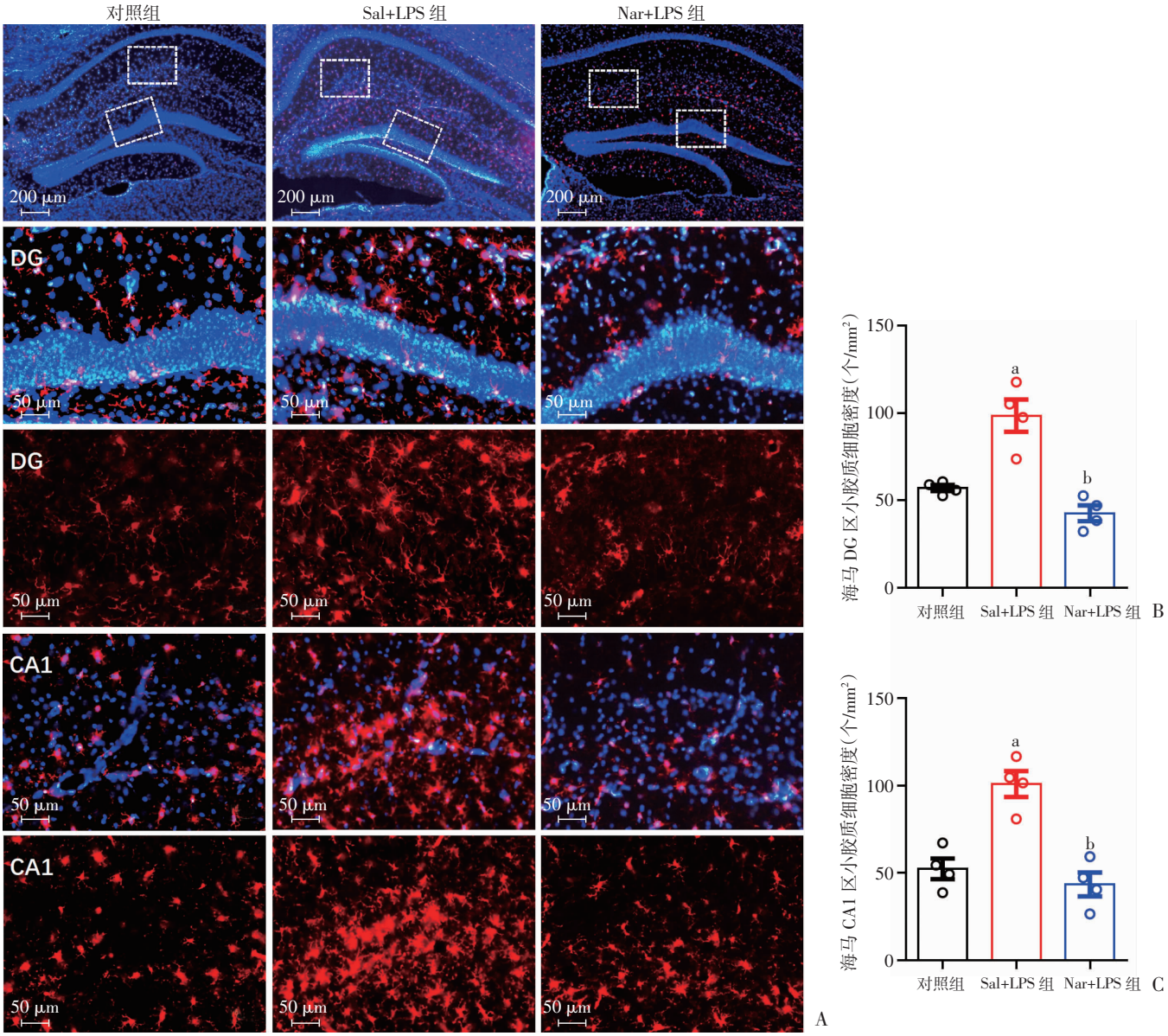


A:蔗糖偏好实验;B:悬尾实验;C:强迫游泳实验 a:$P<0.01$,与对照组相比,b:$P<0.01$,与 Sal+LPS 组相比

图 3 小鼠抑郁样行为

2.4　柚皮苷抑制 LPS 诱导的小鼠海马 DG 区和 CA1 区小胶质细胞的活化

3 组小鼠海马 DG 区小胶质细胞的数量有显著差异(见图 4A、B,$F=52.164$,$P<0.01$),与对照相小鼠相比,Sal+LPS 组小鼠海马 DG 区小胶质细胞数量显著增加($P<0.01$),高倍下观察到细胞的胞体较大、突起更粗,提示 LPS 处理活化 DG 区小胶质细胞;Nar 处理抑制 LPS 引起的 DG 区小胶质细胞的数量增加及功能活化($P<0.01$)。与 DG 区类似,3 组小鼠海马 CA1 区小胶质细胞的数量有显著差异(见图 4A、C,$F=17.674$,$P<0.01$),LPS 处理显著增加 CA1 区小胶质细胞的数量及活化($P<0.01$);而 Nar 处理显著抑制 LPS 对海马 CA1 区小胶质细胞的活化,并减少小胶质细胞的数量。



a:$P<0.01$,与对照组相比,b:$P<0.01$,与 Sal+LPS 组相比

A: Nar 和 LPS 对小鼠海马 DG 区和 CA1 区小胶质细胞的影响 红色:示 Iba1 免疫荧光染色,蓝色:示 DAPI 染色;B:海马 DG 区小胶质细胞密度的分析;C:海马 CA1 区小胶质细胞密度的分析

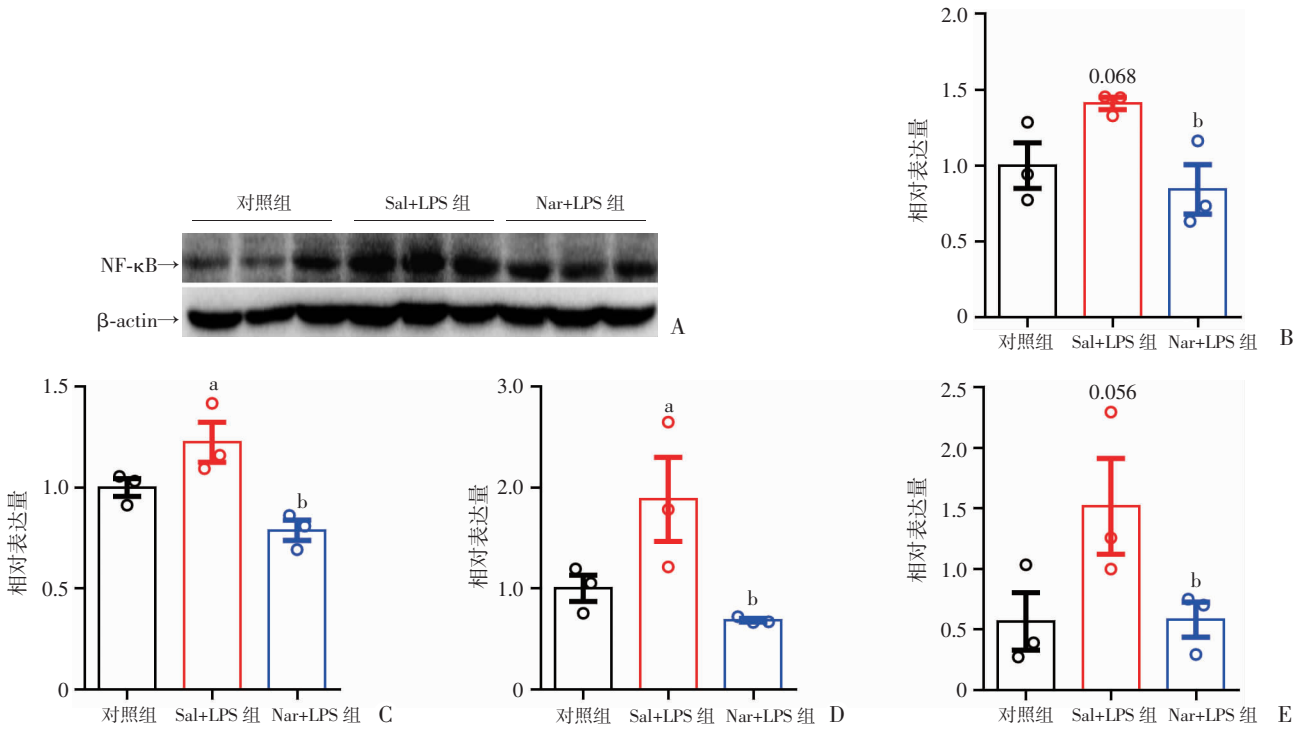
图 4　小鼠海马 DG 区和 CA1 区小胶质细胞

2.5　柚皮苷降低 LPS 引起的小鼠海马内的炎症反应

Western blot 检测 3 组小鼠海马内 NF-κB 的表达水平,结果显示 3 组小鼠存在显著差异(图 5A、B,$F=5.508$,$P<0.05$)。与对照组小鼠相比,Sal+LPS 组小鼠海马内 NF-κB 蛋白表达量升高($P=0.068$),而 Nar 处理抑制 LPS 引起的小鼠海马内升高的 NF-κB 表达($P<0.05$)。荧光定量 PCR 检测发现 3 组小鼠海马内 NF-κB mRNA 的表达水平亦存在显著差异(图 5C,$P<0.05$,$F=11.261$)。与对照组小鼠相比,Sal+LPS 组小鼠海马内 NF-κB mRNA 的表达水平显著升高($P<0.05$);Nar 处理抑制 LPS 引起的海马内升高的 NF-κB mRNA 表达量($P<0.01$),表明 Nar 预处理可以抑制 LPS 引起的小鼠海马内 NF-κB 蛋白和 mRNA 的表达的表达。对海马内炎症因子的检测发现,3 组小鼠海马内 TNF-α mRNA(图 5D,$P<0.05$,$F=6.055$)和 IL-1β mRNA(图 5E,$F=4.073$,$P<0.05$)的表达水平亦存在显著差异。与对照组小鼠相比,Sal+LPS 组小鼠海马内 IL-1β mRNA($P=0.056$)和 TNF-α mRNA 的表达水平升高($P<0.05$),而 Nar 处理抑制 LPS 引起的海马内升高的 IL-1β mRNA($P<0.05$)和 TNF-α mRNA($P<0.01$)的表达水平,表明 Nar 预处理可以抑制 LPS 引起的小鼠海马内炎症因子 TNF-α mRNA 和 IL-1β mRNA 的表达。

3　讨论

近年研究显示,柚皮苷及其代谢物对代谢综合征、认知缺陷和胆碱能功能障碍、慢性支气管炎、缺血性脑损伤等疾病的预防有一定改善作用[5, 18-22]。结果表明,LPS 增加了小鼠的抑郁样行为包括减少小鼠的糖水偏好,增加悬尾和强迫游泳的静止不动时间,连续 8 d 腹腔注射柚皮苷,则显著改善抑郁样行为。这些发现也证实了先前的报道,即柚皮苷可以改善皮质酮诱导的小鼠抑郁样行为[23]。抑郁样行为往往合并探索行为减退和焦虑样行为。矿场的总距离和分时段距离反映小鼠的探索行为,结果显示 LPS 和柚皮苷对小鼠的探索行为无显著影响。既往研究报道单次柚皮苷或低剂量柚皮苷处理可以改善焦虑样行为。我们采用矿场中央时间、黑白箱实验和高架十字迷宫实验检测小鼠的焦虑样行为,实验结果显示:LPS 和柚皮苷对小鼠的焦虑样行为无显著影响。提示在本实验中检测到的柚皮苷的抗抑郁活性与焦虑及探索行为均无明显相关性。



A:小鼠海马内 NF-κB 的蛋白表达水平;B:海马中 NF-κB 表达量　b:$P<0.05$,与 Sal+LPS 组相比;C:小鼠海马中 NF-κB mRNA 的表达　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 Sal+LPS 组比较;D:小鼠海马中 TNF-α mRNA 的表达　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 Sal+LPS 组比较;E:小鼠海马中 IL-1β mRNA 的表达　b:$P<0.05$,与 Sal+LPS 组比较

图 5　小鼠海马 NF-κB 蛋白水平及 NF-κB,TNF-α 和 IL-1β mRNA 的表达水平

大量研究表明,抑郁与脑缺血、氧化应激、线粒体功能受损、自噬抑制、细胞坏死和凋亡、感染、炎症等疾病有关[24]。对动物模型的多项研究支持抑郁的发生发展是由炎症引起的。此外,LPS 引起动物出现抑郁样行为和大脑中促炎细胞因子浓度增加高度相关[25-26]。海马体包含多种受体,是控制行为、调节情绪和认知的重要大脑区域,容易受到应激损伤,其病理特征是抑郁的发病机制和维持的重要因素。小胶质细胞是中枢神经系统中的常驻免疫细胞,具有免疫监视和清除病原微生物、损伤坏死细胞的功能,参与改变基础神经免疫环境和对传入炎症信号的反应[27]。对小鼠海马进行 Iba1 染色,结果显示 LPS 引起小鼠海马 DG 和 CA1 区小胶质细胞数量增加,并呈现明显活化,而柚皮苷预处理则显著抑制 LPS 引起的小鼠海马内小胶质细胞活化效应。提示柚皮苷可以显著抑制海马内的神经炎症反应。

然而,小胶质细胞的过度活化可激活炎症通路导致 IL-1β、TNFα、iNOS 等炎症细胞因子的增加,促发脑功能受损[25]。NF-κB 通路是炎症通路的主要介质之一,在 LPS 作用下被激活后,NF-κBp65 亚基就会转移到细胞核中,参与了促炎细胞因子的表达[29]。课题组前期研究证实 LPS 引起的小鼠抑郁样行为与激活海马中的 NF-κB 相关,而采用白藜芦醇进行干预在抑制 NF-κB 的同时亦明显改善小鼠的抑郁样行为[10]。本研究中也有类似的观察结果,表明 LPS 处理导致海马内小胶质细胞激活,NF-κB 水平升高,柚皮苷预处理可降低这些作用。实验和临床研究表明,促炎细胞因子,包括 IL-1β 与和 TNF-α 在抑郁症的病理生理学中起着关键作用,并且与抑郁症状呈正相关。过量的 IL-1β 过度表达可过度激活下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)轴。升高的 TNF-α 水平可以激活 5-HT 转运蛋白并促进 5-HT 的突触前再摄取,这导致突触中 5-HT 水平降低引起的抑郁[25]。我们通过荧光定量 PCR 检测小鼠海马内 IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 表达水平,发现柚皮苷预处理显著抑制 LPS 引起的小鼠海马内 IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 水平升高。表明 Nar 通过抑制海马内 IL-1β 和 TNF-α 的表达而抑制 HPA 轴过度激活,这也可能 Nar 是抗抑郁的作用机制之一。

综上所述,LPS 引起的小鼠抑郁样行为与海马内小胶质细胞活化。NF-κB 通路激活及炎症因子的释放高度相关,而柚皮苷预处理通过抑制海马内的炎症反应而改善小鼠的抑郁样行为。柚皮苷具有高剂量下的长期安全性,为临床上有效防治抑郁症提供了新的治疗策略。

参考文献:

[1] NANDEESH R, VIJAYAKUMAR S, MUNNOLLI A, *et al*. Bioactive phenolic fraction of *Citrus maxima* abate lipopolysaccharide-induced sickness behaviour and anorexia in mice: in-silico molecular docking and dynamic studies of biomarkers against NF-κB[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108: 1535-1545. DOI:10.1016/j.biopha.2018.10.004.

[2] ZHANG B, WANG P P, HU K L, *et al*. Antidepressant-like effect and mechanism of action of honokiol on the mouse lipopolysaccharide (LPS) depression model[J]. Molecules, 2019, 24(11): 2035. DOI:10.3390/molecules24112035.

[3] CHEN H F, MA Y N, CHEN M, *et al*. Safflower extract improves depression in mice by inhibiting the TLR4-NLRP3 inflammation signaling pathway[J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(7): 8015-8023. DOI:10.21037/apm-21-1728.

[4] URYASH A, MIJARES A, FLORES V, *et al*. Effects of naringin on cardiomyocytes from a rodent model of type 2 diabetes[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 719268. DOI:10.3389/fphar.2021.719268.

[5] LIU K, WU L G, SHI X L, *et al*. Protective effect of naringin against ankylosing spondylitis via ossification, inflammation and oxidative stress in mice[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(2): 1153-1158. DOI:10.3892/etm.2016.3410.

[6] BEN-AZU B, NWOKE E E, ADERIBIGBE A O, *et al*. Possible neuroprotective mechanisms of action involved in the neurobehavioral property of naringin in mice[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 536-546. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.055.

[7] ARIOZ B I, TASTAN B, TARAKCIOGLU E, *et al*. Melatonin attenuates LPS-induced acute depressive-like behaviors and microglial NLRP3 inflammasome activation through the SIRT1/Nrf2 pathway[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1511. DOI:10.3389/fimmu.2019.01511.

[8] GIL M, KIM Y K, HONG S B, *et al*. Naringin decreases TNF-α and HMGB1 release from LPS-stimulated macrophages and improves survival in a CLP-induced *Sepsis* mice[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164186. DOI: 10.1371/journal.pone.0164186.

[9] DEVRAJ V M, VEMURI S K, BANALA R R, *et al*. Evaluation of anti-inflammatory and regenerative efficiency of naringin and naringenin in degenerated human nucleus pulposus cells: biological and molecular modeling studies[J]. Asian Spine J, 2019, 13(6): 875-889. DOI: 10.31616/asj.2019.0073.

[10] LIU L, ZHANG Q, CAI Y L, *et al*. Resveratrol counteracts lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors via enhanced hippocampal neurogenesis[J]. Oncotarget, 2016,

7(35): 56045-56059. DOI:10.18632/oncotarget.11178.

[11] SI L, WANG Y Y, LIU M, *et al*. Expression and role of microRNA-212/nuclear factor I-A in depressive mice[J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 11520-11532. DOI: 10.1080/21655979.2021.2009964.

[12] LIU S B, XU S L, WANG Z J, *et al*. Anti-depressant-like effect of sinomenine on chronic unpredictable mild stress-induced depression in a mouse model[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 76467653. DOI:10.12659/MSM.908422.

[13] ZHANG B, WANG P P, HU K L, *et al*. Antidepressant-like effect and mechanism of action of honokiol on the mouse lipopolysaccharide (LPS) depression model[J]. Molecules, 2019, 24(11): 2035. DOI:10.3390/molecules24112035.

[14] DANG R Z, WANG M Y, LI X H, *et al*. Edaravone ameliorates depressive and anxiety-like behaviors via Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 pathway[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 41. DOI:10.1186/s12974-022-02400-6.

[15] SONG A Q, GAO B, FAN J J, *et al*. NLRP1 inflammasome contributes to chronic stress-induced depressive-like behaviors in mice[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 178. DOI:10.1186/s12974-020-01848-8.

[16] KWON H S, KOH S H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes[J]. Transl Neurodegener, 2020, 9(1): 42. DOI:10.1186/s40035-020-00221-2.

[17] HICKMAN S, IZZY S, SEN P, *et al*. Microglia in neurodegeneration[J]. Nat Neurosci, 2018, 21(10): 1359-1369. DOI:10.1038/s41593-018-0242-x.

[18] LI Z L, YANG B C, GAO M, *et al*. Naringin improves *Sepsis*-induced intestinal injury by modulating macrophage polarization via PPARγ/miR-21 axis[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 25: 502-514. DOI:10.1016/j.omtn.2021.07.005.

[19] MENG X D, FU M M, WANG S F, *et al*. Naringin ameliorates memory deficits and exerts neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease by regulating multiple metabolic pathways[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5): 332. DOI:10.3892/mmr.2021.11971.

[20] GOPINATH K, SUDHANDIRAN G. Naringin modulates oxidative stress and inflammation in 3-nitropropionic acid-induced neurodegeneration through the activation of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 signalling pathway[J]. Neuroscience, 2012, 227: 134-143. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.07.060.

[21] DAYARATHNE L A, RANAWEERA S S, NATRAJ P, *et al*. The effects of naringenin and naringin on the glucose uptake and AMPK phosphorylation in high glucose treated HepG2 cells[J]. J Vet Sci, 2021, 22(6): e92. DOI:10.4142/jvs.2021.22.e92.

[22] BEN-AZU B, NWOKE E E, ADERIBIGBE A O, *et al*. Possible neuroprotective mechanisms of action involved in the neurobehavioral property of naringin in mice[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 536-546. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.055.

[23] GAO C, WU M L, DU Q H, *et al*. Naringin mediates adult hippocampal neurogenesis for antidepression via activating CREB signaling[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 731831. DOI:10.3389/fcell.2022.731831.

[24] FANG K, LI H R, CHEN X X, *et al*. Quercetin alleviates LPS-induced depression-like behavior in rats via regulating BDNF-related imbalance of copine 6 and TREM1/2 in the *Hippocampus* and PFC[J]. Front Pharmacol, 2020, 10: 1544. DOI:10.3389/fphar.2019.01544.

[25] LI M M, LI C L, YU H J, *et al*. *Lentivirus*-mediated interleukin-1β (IL-1β) knock-down in the *Hippocampus* alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficits and anxiety- and depression-like behaviors in mice[J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 190. DOI: 10.1186/s12974-017-0964-9.

[26] ZHOU H C, WANG X H, ZHANG B. Depression of lncRNA NEAT1 antagonizes LPS-evoked acute injury and inflammatory response in alveolar epithelial cells via HMGB1-RAGE signaling[J]. Mediators Inflamm, 2020, 2020: 8019467. DOI:10.1155/2020/8019467.

[27] TAO X, YAN M Z, WANG L S, *et al*. Homeostasis imbalance of microglia and astrocytes leads to alteration in the metabolites of the kynurenine pathway in LPS-induced depressive-like mice[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(4): 1460. DOI:10.3390/ijms21041460.

[28] HUANG X, FEI G Q, LIU W J, *et al*. Adipose-derived mesenchymal stem cells protect against CMS-induced depression-like behaviors in mice via regulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF-κB signaling pathways[J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(5): 612-619. DOI: 10.1038/s41401-019-0317-6.

[29] WANG L, YANG J W, LIN L T, *et al*. Acupuncture attenuates inflammation in microglia of vascular dementia rats by inhibiting miR-93-mediated TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 8253904. DOI:10.1155/2020/8253904.

[30] NAKAMOTO C, KAWAMURA M, NAKATSUKASA E, *et al*. GluD1 knockout mice with a pure C57BL/6N background show impaired fear memory, social interaction, and enhanced depressive-like behavior[J]. PLoS One, 2020, 15(2): e0229288. DOI:10.1371/journal.pone.0229288.

(收稿:2022-07-06;修回:2022-09-27)

(编辑 张艺霖)