

基于网络药理学和细胞实验探讨橙皮素对 LPS 诱导的小胶质细胞炎症模型的改善作用

高欣^{1,2}, 刘俊君^{1,3}, 荆尚文^{1,3}, 潘亚茹^{1,3}, 苏世杰^{1,3}, 李伟荣^{1,3}, 赵威^{1,3},
黄水清^{1,3}, 王奇^{1,3*}

(1. 广州中医药大学科技创新中心, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学实验动物中心, 广东 广州 510405; 3. 广州中医药大学临床药理研究所, 广东 广州 510405)

摘要: 目的 通过网络药理学和细胞实验研究橙皮素对脂多糖 (LPS) 诱导的小胶质细胞炎症模型的改善作用。方法 筛选橙皮素治疗神经炎症的关键成分, 构建 PPI 网络, 筛选核心节点网络, 并进行 GO 及 KEGG 富集分析。细胞实验分为空白对照组、LPS (100 ng/mL) +ATP (5 μ mol/L) 组、橙皮素组 (20、40 μ mol/L), MTT 法检测细胞存活率, Griess 法检测 NO 水平, 免疫荧光法检测 ROS 以及小胶质细胞标记物 IBA1 表达, RT-qPCR 法检测 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6* mRNA 表达, Western Blot 法检测 RAGE 蛋白表达。结果 PPI 网络分析得到 88 个核心靶点。KEGG 富集分析显示, 橙皮素主要通过细菌起源分子的反应、脂多糖反应调节、炎症反应调节等改善神经炎症。细胞实验显示, 橙皮素能抑制 LPS 诱导的小胶质细胞炎症反应, 降低细胞上清液 NO 水平、细胞 ROS 水平、IBA1 表达以及 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6* mRNA 表达、RAGE 蛋白表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 橙皮素具有改善小胶质细胞极化、抗神经炎症作用, 其机制与下调 AGE/RAGE 介导的炎症信号通路有关。

关键词: 橙皮素; 脂多糖; 小胶质细胞; 神经炎症; 网络药理学; 细胞实验

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)05-1707-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.05.049

神经炎症是阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病的重要病理特征^[1]。作为神经退行性疾病的主要病理特征, 神经炎症与中枢神经系统中小胶质细胞的激活密切相关^[2]。小胶质细胞极化介导促炎因子的释放会促进神经炎症的形成, 导致神经元凋亡或坏死, 加重神经退行性疾病^[3]。

高级糖基化终产物 (AGEs) 是来源于糖类对大分子翻译后非酶修饰的异质分子。研究表明, 生理性衰老^[4]、神经炎症^[5]、神经退行性疾病^[6-7]中 AGEs 血浆水平升高。其中炎症反应激活并诱导了小胶质细胞代谢重编程^[8-10]。AGEs 通过与其糖基化终产物受体 (RAGE) 结合, 导致转录因子 NF- κ B 的激活以及相关促炎因子水平升高^[11]。此外, 与 RAGE 结合还可以刺激活性氧 (ROS) 的产生, 这与神经元死亡有关^[12]。

橙皮素是一种主要存在于柑橘类水果中的黄酮类化合物, 具有抗炎、清除自由基、神经保护作用^[13-17]。橙皮素可通过调节 NF- κ B 信号通路减轻 LPS 诱导的神经炎症及凋亡^[18], 但橙皮素对 AGE/RAGE 通路的调节作用尚未阐释。脂多糖 (LPS) 是革兰氏阴性菌的一种膜成分, 可激

活中枢免疫系统引起神经炎症反应^[19]。本研究通过网络药理学探讨橙皮素治疗神经炎症的潜在作用靶点, 进而采用 LPS 诱导小胶质细胞建立神经炎症模型, 检测橙皮素对细胞上清液一氧化氮、细胞内 ROS 水平、炎症因子和 RAGE 蛋白的表达的影响, 验证橙皮素改善神经炎症的作用机制。

1 材料

1.1 试剂 橙皮素 (上海毕得医药科技股份有限公司, 批号 RPY837, 纯度 97%); 脂多糖 (LPS, 上海源叶生物科技有限公司, 批号 J17GS153954); ATP-Na₂、胰酶细胞消化液、Hanks 平衡盐溶液、一氧化氮检测试剂盒、二甲基亚砜 (DMSO) (上海碧云天生物技术股份有限公司, 货号 ST1092、C0207、C0218、S0021S、ST038); DMEM 培养基、PBS 缓冲液、胎牛血清 (FBS)、青霉素-链霉素 (美国 Gibco 公司, 货号 11965118、10010031、A3160902、15070063); 活性氧 (ROS) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所有限公司, 货号 E004-1-1); MTT (德国 Biofrox 公司, 批号 EZ7890B104); IBA1 抗体 [艾比玛特生物医药 (上海) 有限公司, 货号 T57217]; RAGE 抗体、山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488) (英国 Abcam 公司, 货号 ab

收稿日期: 2023-01-05

基金项目: 广东省科技计划国际科技合作项目 (2020A0505100052); 广东省普通高校重点实验室项目 (2019KSYS005); 广州市科技计划项目 (201803010047)

作者简介: 高欣 (1980—), 女, 实验师, 从事中医药防治脑病研究。E-mail: cocoko@gzucm.edu.cn

* 通信作者: 王奇 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治脑病研究。E-mail: wqitcm@qq.com

216329、ab150077); β -actin 抗体、山羊抗鼠 IgG (H+L) HRP (美国 Affinity 公司, 货号 AF7018、S0002); 山羊抗兔 IgG (H+L) (美国 CST 公司, 货号 7077S)。

1.2 仪器 台式高速冷冻微量离心机 (美国 SCIOLOGEX 公司); NP80 超微量分光光度计 (上海谱元仪器有限公司); Universal 小型垂直转印电泳系统、ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统、T100 梯度 PCR 扩增仪 (美国 Bio-Rad 公司); Synergy HT 全波长酶标仪 (美国 BioTek 公司); Prism[®] 7500 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1.3 细胞 BV2 小鼠小胶质细胞株购于广州吉妮欧生物科技有限公司。用于提取原代小胶质细胞的 C57BL/6 乳鼠购于广州中医药大学实验动物中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (粤) 2018-0034, 动物合格证号 44005800013572。本研究经广州中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理号 20220116004)。取出生后 1~3 d 的新生 C57BL/6 小鼠的脑组织, 置于 Hanks 平衡盐溶液中, 在解剖镜下剥离血管膜。将剥离完血管膜的脑组织放入预置有适量 0.125% 胰酶的小皿中, 剪碎 (<1 mm³), 37 °C 下孵育 15 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 细胞重悬后培养 12 h 换液, 每 3 d 换 1 次液, 培养 14 d 后取出, 37 °C 下摇床中 250 r/min 振荡 3 h 取上清液, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 完全培养基重悬, 即得纯化后的小胶质细胞。

2 方法

2.1 网络药理学研究

2.1.1 橙皮素与神经炎症靶点筛选 以“neuroinflammation”为关键词, 在 OMIM 在线人类孟德尔遗传数据库^[20] (<https://www.omim.org/>) 和 Gene Cards 人类基因数据库^[21] (<https://www.genecards.org/>) 检索并获取神经炎症表型相关靶点。同时以“hesperetin”为关键词, 通过中药系统药理学数据库与分析平台^[22] (TCMSP, <https://www.tcmsp-e.com/>)、Drug bank 数据库^[23] (<https://www.drugbank.ca/>)、Pharm Mapper 数据库^[24] (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)、中药高通量实验和参考数据库^[25] (HERB, <http://herb.ac.cn/>)、Therapeutic Target Database 药物靶标数据库^[26] (TTD, <http://db.idrblab.net/ttd/>)、BindingDB 数据库^[27] (<https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp>)、ChEMBL 数据库^[28] (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>)、GeneCards 数据库获取现有或预测橙皮素可能存在的作用靶点。整合后导入 UniProt 数据库^[29] (<https://www.uniprot.org/>) 获得规范化靶点基因简称及其 UniProt ID。将神经炎症表现的靶点与药物橙皮素的靶点分别导入软件 R (version 4.0.1) 中, 绘制 Venn 图, 并获取主要交集靶点信息。

2.1.2 交集靶点蛋白相互作用网络构建 将神经炎症及橙皮素的交集靶点导入至 STRING 数据库^[30] (<https://string-db.org/>, version 11.0), 利用“multiple proteins”搜索功能, 把物种设定为“homo sapiens”, 在关联度为 0.4 的条

件下, 构建共同靶点的相互作用 (PPI) 网络。

2.1.3 GO、KEGG 通路富集分析 将交集靶点输入 Metascape 数据库^[31] (<https://metascape.org/>) 进行 GO 通路富集分析, 从靶细胞的分子功能 (molecular function, MF)、细胞成分 (cellular component, CC) 和生物过程 (biological process, BP) 确定基因富集的功能, *P* 值与富集程度呈正相关, 选取筛选校正后 *P*<0.05 的富集结果。将结果绘制成相应气泡图; 利用 KEGG 途径富集分析获得枢纽靶点作用的途径, 将结果绘制成相应气泡图。

2.2 细胞实验研究

2.2.1 细胞培养及药物干预 将 BV2 或原代小胶质细胞接种于完全培养基 DMEM (含 10% FBS, 1% 双抗) 中, 置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。当细胞量达到 80% 左右时进行传代, 取对数生长期的细胞进行实验。将橙皮素完全溶解于 DMSO 制成 1 mol/L 橙皮素母液, 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 用 DMEM 分别稀释至浓度为 20、40 μ mol/L, -20 °C 保存, 备用。将细胞分为正常组、模型组和橙皮素低、高剂量组。正常组细胞在 DMEM 培养基中培养, 模型组细胞给予 100 ng/mL LPS 以及 5 μ mol/L ATP, 橙皮素各剂量组是在模型组的基础上分别给予 20、40 μ mol/L 橙皮素。

2.2.2 MTT 法检测细胞存活率 收集对数生长期的 BV2 或原代小胶质细胞, 调整密度至 5×10^3 /孔, 接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后分别给予 0、5、10、20、40、100、200 μ mol/L 橙皮素或者 0、0.01、0.1、1、10、100 μ g/mL LPS+5 μ mol/L ATP 处理 24 h。取出细胞培养板, 每孔加入 110 μ L 含 10 μ L MTT (5 mg/mL) 的 DMEM, 继续培养 4 h。于 490 nm 波长处检测光密度 (OD) 值, 计算细胞存活率。

2.2.3 Griess 法检测细胞上清液 NO 水平 收集对数生长期的 BV2 或原代小胶质细胞, 调整密度至 5×10^3 /孔, 接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后按“2.2.1”项下分组给予相应药物处理 24 h。每孔吸取 50 μ L 细胞上清液至新 96 孔板中, 依次加入 Griess Reagent I 和 Griess Reagent II 各 50 μ L/孔, 于 540 nm 波长处检测 OD 值, 计算细胞上清液中 NO 水平。

2.2.4 免疫荧光法检测细胞 ROS 水平与 IBA1 表达 严格按照相关试剂盒说明书操作, 用无血清培养基将 DCFH-DA 荧光探针稀释到 10 μ mol/L, 加入小胶质细胞中, 37 °C 避光孵育 1 h, PBS 充分洗涤, 除去未进入细胞内的 DCFH-DA, 荧光显微镜下观察。干预后的小胶质细胞在预冷 4% 多聚甲醛固定后, 10% 正常山羊血清封闭, IBA1 一抗 4 °C 孵育过夜, Alexa Fluor 488 荧光二抗常温孵育 1 h, 含 DAPI 抗荧光淬灭封片剂封片, 荧光显微镜下观察。

2.2.5 RT-qPCR 检测 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6* mRNA 表达 收集 BV2 或原代小胶质细胞, 调整密度至 1×10^6 /孔, 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后按“2.2.1”项下分组给予相应药物处理 24 h, 每组 3 个复孔, 重复 3 次。TRIzol 法提取各组

总 RNA, 测定其纯度, AG 试剂盒对其进行逆转录, SYBR Green qPCR 试剂盒对 cDNA 进行 qRT-PCR。2^{-ΔΔCT}法计算目的基因 mRNA 相对表达量, 以 β -actin 为内参。引物序列见表 1, 扩增条件为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s, 共 40 个循环。

表 1 引物序列

基因	序列(5'→3')
IL-6	正向 CTCCCAACAGACCTGTCTATAC
	反向 CCATTGCACAACCTTTTCTCA
IL-1 β	正向 CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC
	反向 TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGATC
TNF- α	正向 ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTCC
	反向 GCTTGTCACTCGAATTTTGAGA
β -actin	正向 CTACCTCATGAAGATCCTGACC
	反向 CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC

2.2.6 Western blot 法检测 RAGE 蛋白表达 收集 BV2 或原代小胶质细胞, 调整密度至 1×10^6 /孔, 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后按“2.2.1”项下分组给予相应药物处理 24 h, 每组 3 个复孔, 重复 3 次。RIPA 裂解液提取细胞蛋白, UV 法测定其蛋白纯度。蛋白样本经 SDS-PAGE 电泳进行, 转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉在 4 °C 下封闭过夜。

加入一抗 4 °C 下孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入二抗室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 试剂显色, ChemiDoc XRS+化学发光成像系统采集图像, 以 β -actin 为内参, 计算蛋白条带灰度值。

2.2.7 统计学分析 通过 GraphPad Prism 5 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析和 Turkey 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 神经炎症与橙皮素潜在靶点筛选 神经炎症相关靶点共 758 个, 橙皮素潜在靶点 421 个, 将橙皮素潜在靶点与神经炎症相关靶点进行交集并绘制 Venn 图, 见图 1。结果显示, 两者有共同靶点 89 个, 见表 2。

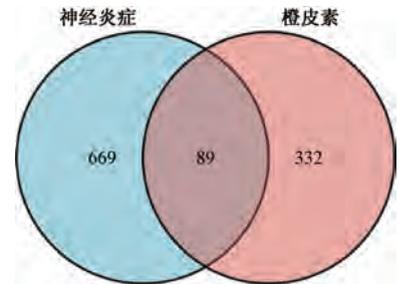


图 1 橙皮素与神经炎症的共有靶点 Venn 图

表 2 橙皮素与神经炎症的共有靶点信息

靶点简称	蛋白 ID	靶点全称	长度/bp
PTGS2	P35354	prostaglandin g/h synthase 2	604
TSPO	B1AH88	putative peripheral benzodiazepine receptor-related protein	102
TSPO	P30536	translocator protein	169
TNF	P01375	tumor necrosis factor	233
NOS2	P35228	nitric oxide synthase, inducible	1 153
NOS2	P60321	nanos homolog 2	138
MMP9	P14780	matrix metalloproteinase-9	707
ADAM17	P78536	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17	824
CNR2	P34972	cannabinoid receptor 2	360
BACE1	P56817	beta-secretase 1	501
SOD1	P00441	superoxide dismutase	154
RELA	Q04206	transcription factor p65	551
MAPK8	P45983	mitogen-activated protein kinase 8	427
MMP2	P08253	72 kDa type IV collagenase	660
HMOX1	P09601	heme oxygenase 1	288
PPARG	P37231	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	505
CCR5	P51681	C-C chemokine receptor type 5	352
CCR7	P32248	C-C chemokine receptor type 7	378
PTGS1	P23219	prostaglandin G/H synthase 1	599
FAS	P25445	tumor necrosis factor receptor superfamily member 6	335
FAS	P49327	fatty acid synthase	2 511
CASP1	P29466	caspase-1	404
PREP	P48147	prolyl endopeptidase	710
PREP	Q5JRX3	presequence protease	1 037
MAPKAPK2	P49137	MAP kinase-activated protein kinase 2	400
ACHE	P22303	acetylcholinesterase	614

续表 2

靶点简称	蛋白 ID	靶点全称	长度/bp
CASP8	Q14790	caspase-8	479
PEBP1	P30086	phosphatidylethanolamine-binding protein 1	187
MAPK14	Q16539	mitogen-activated protein kinase 14	360
JUN	P05412	transcription factor AP-1	331
NOX4	Q9NPH5	NADPH oxidase 4	578
STAT3	P40763	signal transducer and activator of transcription 3	770
GSK3B	P49841	glycogen synthase kinase-3 beta	420
IKBKB	O14920	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	756
IFNG	P01579	interferon gamma	166
ABCB1	P08183	ATP-dependent translocase ABCB1	1 280
OPRM1	P35372	mu-type opioid receptor	400
GRM5	P41594	metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)	1 212
C3	P01024	complement C3	1 663
TP53	P04637	cellular tumor antigen p53	393
HDAC6	Q9UBN7	histone deacetylase 6	1 215
PTGER2	P43116	prostaglandin E2 receptor EP2 subtype	358
BRD4	O60885	bromodomain-containing protein 4	1 362
PLA2G2A	P14555	phospholipase A2, membrane associated	144
PPARGC1A	Q9UBK2	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	798
CCR2	P41597	C-C chemokine receptor type 2	374
DRD3	P35462	D(3) dopamine receptor	400
AKT1	P31749	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	480
MMP1	P03956	interstitial collagenase	469
CASP3	P42574	caspase-3	277
PIK3CG	P48736	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform	1 102
UGT1A1	P22309	UDP-glucuronosyltransferase 1A1	533
PTGER3	P43115	prostaglandin E2 receptor EP3 subtype	390
SRR	Q9GZT4	serine racemase	340
TGFBR1	P36897	TGF-beta receptor type-1	503
CSNK2A1	P68400	casein kinase II subunit alpha	391
NOS3	P29474	nitric oxide synthase, endothelial	1 203
NOS3	P60323	nanos homolog 3	173
CTSB	P07858	cathepsin B	339
ITGB1	P05556	integrin beta-1	798
CNR1	P21554	cannabinoid receptor 1	472
TLR7	Q9NYK1	toll-like receptor 7	1 049
ADORA3	P0DMS8	adenosine receptor A3	318
RPS27A	P62979	ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	156
GRIN2A	Q12879	glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A	1 464
PRKCA	P17252	protein kinase C alpha type	672
VDR	P11473	vitamin D3 receptor	427
ABCG2	Q9UNQ0	broad substrate specificity ATP-binding cassette transporter	655
DRD2	P14416	D(2) dopamine receptor	443
MME	P08473	neprilysin	750
BAX	Q07812	apoptosis regulator BAX	192
BCHE	P06276	cholinesterase	602
ITGA4	P13612	integrin alpha-4	1 032
GRIN2D	O15399	glutamate receptor ionotropic, NMDA 2D	1 336
PLA2G4A	P47712	cytosolic phospholipase A2	749
DICER1	Q9UPY3	endoribonuclease dicer	1 922
ACTA1	P68133	actin, alpha skeletal muscle	377
CASP9	P55211	caspase-9	416

续表 2

靶点简称	蛋白 ID	靶点全称	长度/bp
ADORA1	P30542	adenosine receptor A1	326
CDKN1B	P46527	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	198
GUSB	P08236	beta-glucuronidase	651
SIGMAR1	Q99720	sigma non-opioid intracellular receptor 1	223
XDH	P47989	xanthine dehydrogenase/oxidase	1 333
ADORA2A	P29274	adenosine receptor A2a	412
PTGER2,PTGER4	P35408	prostaglandin E2 receptor EP4 subtype	488
ALOX5AP	P20292	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	161
DRD1	P21728	D(1A) dopamine receptor	446
PDE5A	O76074	cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase	875
NPY2R	P49146	neuropeptide Y receptor type 2	381
VEGFB	P49765	vascular endothelial growth factor B	207
MAP2	P11137	microtubule-associated protein 2	1 827
NAPEPLD	Q6IQ20	N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D	393
GRM4	Q14833	metabotropic glutamate receptor 4	912
MGLL	Q99685	monoglyceride lipase	303

3.2 共同靶点蛋白互作网络构建 将 89 个潜在作用靶点导入至 STRING 数据库, PPI 网络构建结果得出 88 个节点和 686 条边, 平均自由度为 15.4, 见图 2。其中关联度最高的 3 个靶点分别为 TNF (度值 64)、AKT1 (度值 63)、TP53 (度值 45)。



图 2 橙皮素治疗神经炎症的潜在靶点 PPI 网络

3.3 共同靶基因的生物功能及相关通路的富集分析 各选取其排名前 4 位的条目绘制成 GO 富集分析气泡图, 见图 3。生物过程主要包括神经递质受体活动、趋化因子结合、前列腺素类受体的活动、前列腺素受体的活动; 细胞成分主要包括膜区域、膜微区、膜筏、神经元细胞体; 分子功能主要包括细菌起源的分子反应、脂多糖反应调节、炎症反应调节、化学突触传递调节。KEGG 信号通路富集分析结果显示, 排名靠前的富集通路包括对细菌起源分子的反应、脂多糖反应调节、炎症反应调节、化学突触传递的调节、细胞死亡正向调控、脂多糖反应、AGE/RAGE 通路、癌症通路、炎症反应调节、辐射反应、外来生物刺激反应、衰老, 见图 4。

3.4 橙皮素对 LPS 诱导的 BV2 或小胶质细胞存活率的影响 当橙皮素浓度小于 40 μmol/L 时, 橙皮素不存在明显

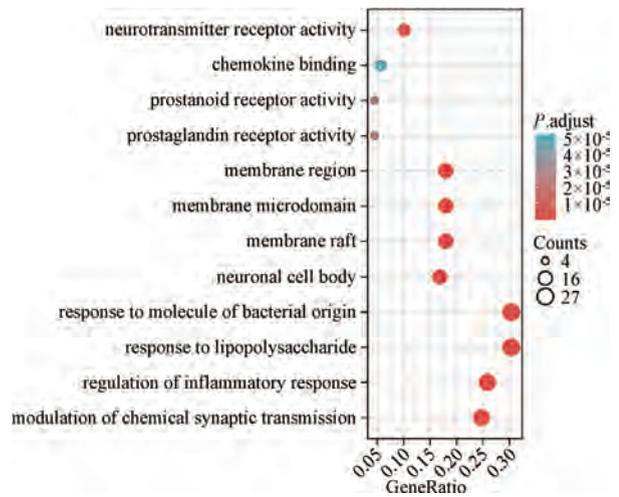


图 3 橙皮素治疗神经炎症的潜在作用靶点 GO 富集分析气泡图

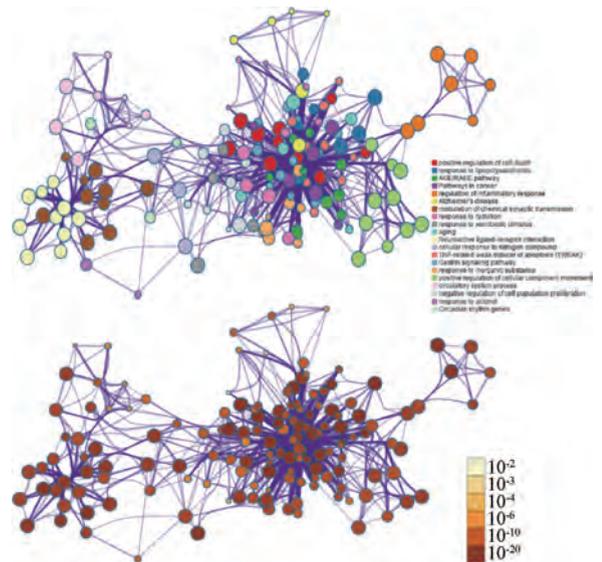
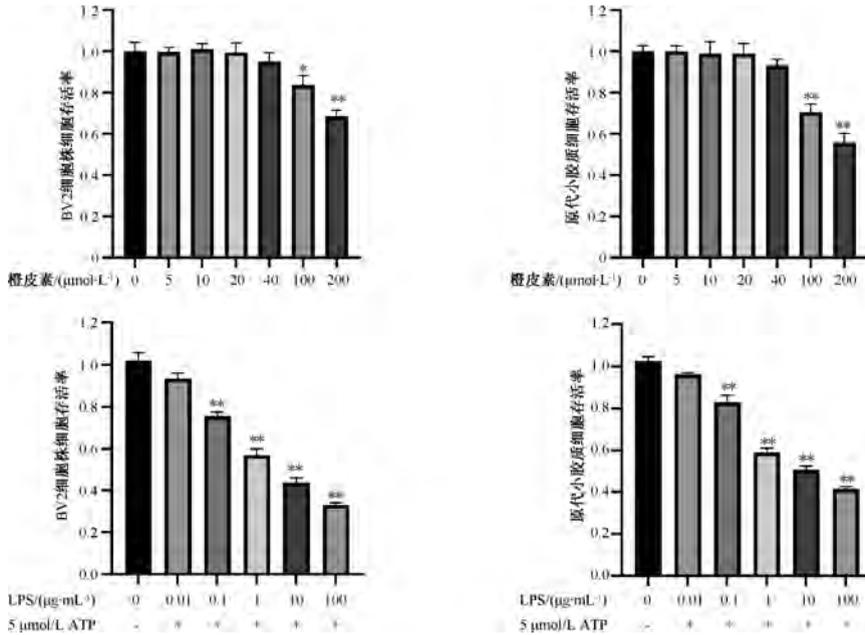


图 4 橙皮素治疗神经炎症的潜在作用靶点 KEGG 富集分析

影响细胞存活的毒性，但当其浓度高于 40 $\mu\text{mol/L}$ 时，BV2 或原代小胶质细胞存活率降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。因此，选择 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度进行下一步实验。BV2 或原代小胶质细胞经 LPS (100 ng/mL) +ATP (5 $\mu\text{mol/L}$) 处理后，

用不同浓度 LPS+ATP 处理 BV2 或原代小胶质细胞 24 h，LPS 质量浓度大于 1 $\mu\text{g/mL}$ 时，其对细胞存活率有较大的影响，因此选择细胞存活率约 70%~80% 时的 LPS 质量浓度 (100 ng/mL) 为实验造模质量浓度，见图 5。

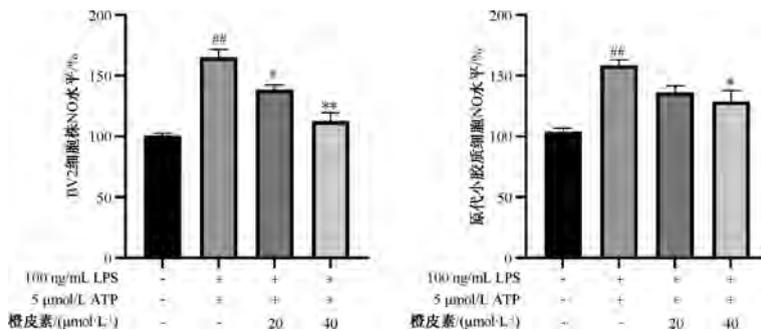


注：与 0 $\mu\text{mol/L}$ 橙皮素 (0 $\mu\text{g/mL}$ LPS+0 $\mu\text{mol/L}$ ATP) 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 5 橙皮素以及 LPS+ATP 模型对 BV2 或小胶质细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.5 橙皮素对 LPS 诱导的 BV2 或小胶质细胞上清液 NO 水平的影响 与正常组比较，模型组细胞上清液 NO 水平升

高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，橙皮素高剂量组细胞上清液 NO 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，见图 6。



注：与正常组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 6 橙皮素对 LPS 诱导的 BV2 或小胶质细胞上清液 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 橙皮素对 LPS 诱导的 BV2 或小胶质细胞 ROS 水平的影响 与正常组比较，模型组细胞 ROS 水平升高；与模型组比较，橙皮素高剂量组细胞 ROS 水平降低，见图 7。

3.7 橙皮素对 LPS 诱导的 BV2 或小胶质细胞 IBA1 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组细胞 IBA1 表达升高，表明小胶质细胞被激活；与模型组比较，橙皮素高剂量组细胞 IBA1 表达降低，表明橙皮素可以改善 LPS 诱导的小胶质细胞活化，见图 8。

3.8 橙皮素对 LPS 诱导的 BV2 或原代小胶质细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ mRNA 表达的影响 与正常组比较，模型组细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)；与模

型组比较，橙皮素各剂量组细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ mRNA 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，并呈剂量依赖性，见图 9。

3.9 橙皮素对 LPS 诱导的 BV2 或原代小胶质细胞 RAGE 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组细胞 RAGE 蛋白表达升高；与模型组比较，橙皮素高剂量组细胞 RAGE 蛋白表达降低，见图 10。

4 讨论

神经炎症在许多神经退行性疾病的发病机制中起着关键作用，而小胶质细胞的活化参与了神经炎症反应的启动^[32]。一般情况下小胶质细胞处于静息状态^[33]，病理状态下小胶质细胞发生活化，并释放促炎症因子，参与神经炎

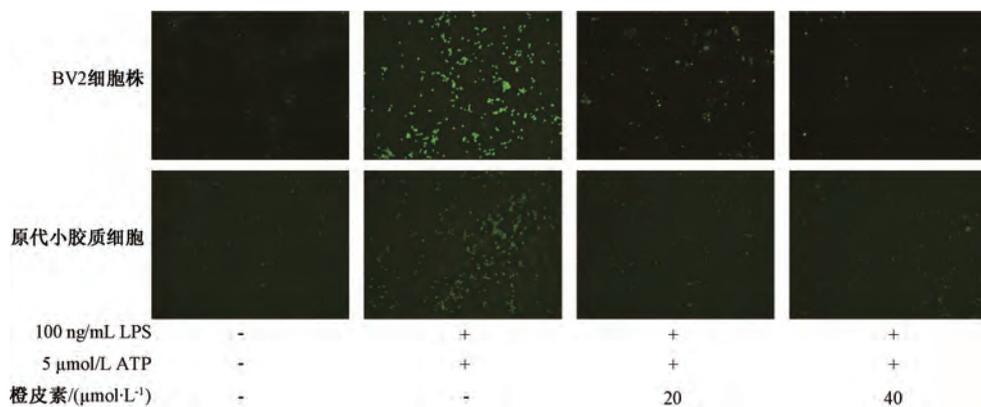


图7 橙皮素对LPS诱导的BV2或小胶质细胞内ROS水平的影响

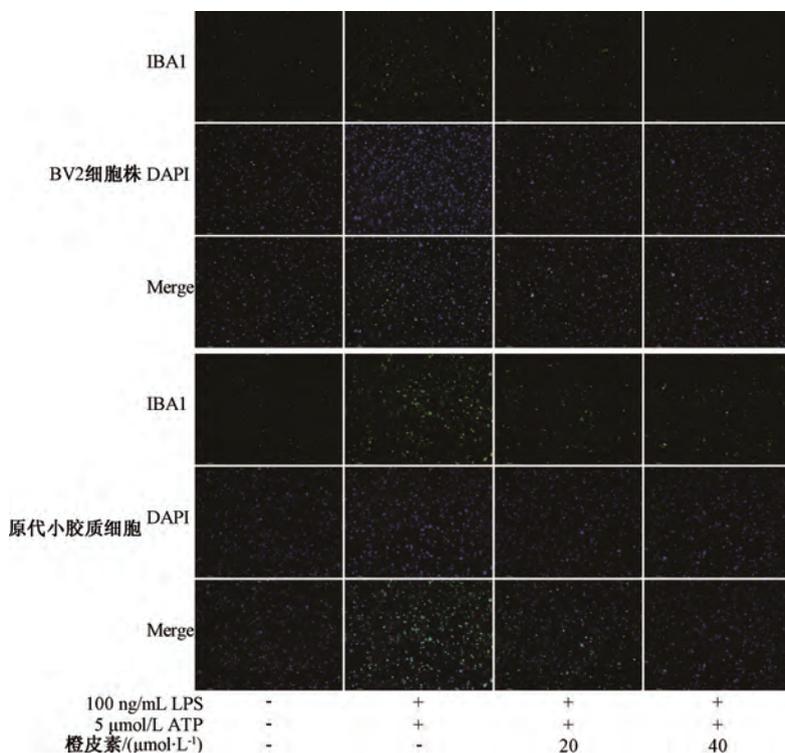
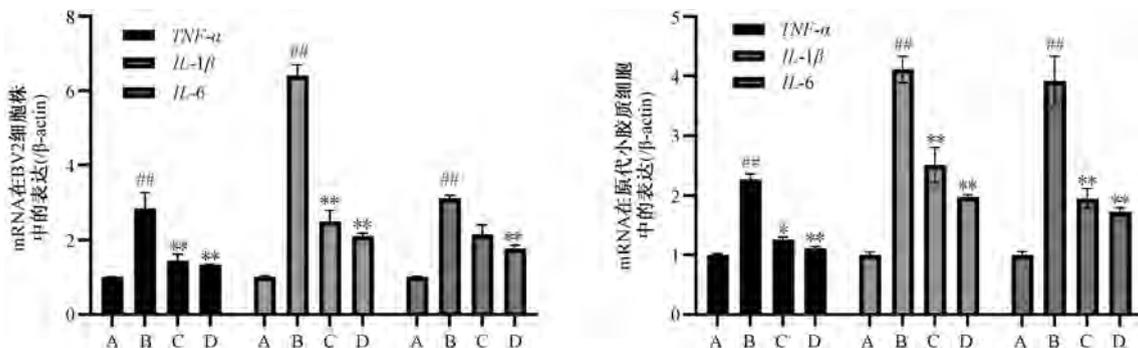


图8 橙皮素对LPS诱导的BV2或小胶质细胞IBA1蛋白表达的影响



注：A~D分别为正常组、模型组、橙皮素低剂量组、橙皮素高剂量组。与正常组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图9 橙皮素对LPS诱导的BV2或原代小胶质细胞TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

症的发生发展。小胶质细胞的持续激活产生的过量炎症因子会对神经细胞造成损伤^[34]。因此，调节小胶质细胞过度

激活被认为是开发治疗或预防与炎症相关的神经退行性疾病药物的有效途径^[35]。

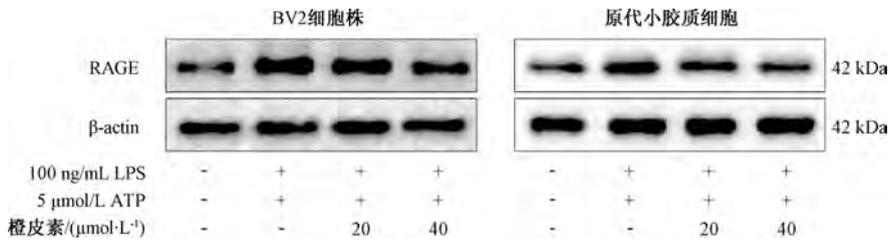


图 10 橙皮素对 LPS 诱导的 BV2 或小胶质细胞 RAGE 蛋白表达的影响

橙皮素是一种主要存在于柑橘类水果中的黄酮类化合物，具有抗炎、清除自由基、神经保护等药理作用^[18,36-38]。LPS 可诱导小胶质细胞的过度活化，导致神经元功能受损^[39]。本研究结果显示，与正常组比较，LPS 诱导的小胶质细胞活化，IBA1 表达上调，促炎因子表达升高，而橙皮素可以下调 LPS 诱导的小胶质细胞的促炎因子释放，表明橙皮素能有效改善小胶质细胞活化。研究表明，促炎细胞因子释放的同时会诱导机体产生大量 NO，造成血管过度舒张和细胞损伤，导致炎症反应及相关病变^[40]。本研究结果提示，橙皮素能降低 LPS 诱导小胶质细胞的 NO 产生。细胞内 ROS 信号的过度积累是促进炎症因子水平的重要原因^[41]，本研究发现，LPS 诱导的小胶质细胞体内的 ROS 水平升高而引发氧化应激，而橙皮素干预后小胶质细胞 ROS 水平降低，这进一步证明了橙皮素具有抗氧化的作用。

通过网络药理学通路富集分析，橙皮素发生抗炎作用与 AGE/RAGE 通路密切相关。AGEs 的信号积累是细胞和组织正常衰老的特征，已有研究表明，年轻和老年脑内在同一区域的神经元和神经胶质细胞中 AGEs 呈年龄和阶段依赖分布，AGEs 阳性神经元和星形胶质细胞的百分比随着年龄和神经退行性疾病的进展而增加^[42]。晚期糖基化终产物的受体 (RAGE) 是免疫球蛋白超家族的一种跨膜受体，在各种慢性炎症性疾病中表达上调。既往研究表明，AD 患者的 RAGE 免疫反应性小胶质细胞数量明显增加^[43]。总之，高浓度的 AGEs 和 RAGE 自分泌上调的结合可能导致 RAGE 介导的炎症导致神经退行性变的恶性循环。本研究也证实了 RAGE 蛋白的表达在 LPS 诱导的小胶质细胞中增多，而橙皮素能下调 RAGE 蛋白表达，逆转小胶质细胞的过度激活，发挥抗炎作用。

橙皮素对 LPS 诱导的小胶质细胞过度活化具有抑制作用，该作用可能是通过抑制 RAGE 蛋白的表达，降低细胞氧化应激及氮化应激水平，降低 TNF-α、IL-1β、IL-6 等促炎因子的释放而实现的。本研究结果表明，橙皮素通过抑制 AGE/RAGE 通路级联激活而发挥抗神经炎症作用。

参考文献:

[1] Batista C R A, Gomes G F, Candelario-Jali E, et al. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (9): 2293.
[2] Hickman S, Izzy S, Sen P, et al. Microglia in neurodegeneration [J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(10): 1359-1369.

[3] Voet S, Srinivasan S, Lamkanfi M, et al. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases [J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(6): e10248.
[4] Kim C S, Park S, Kim J. The role of glycation in the pathogenesis of aging and its prevention through herbal products and physical exercise [J]. *J Exerc Nutrition Biochem*, 2017, 21 (3): 55-61.
[5] Wetzels S, Vanmierlo T, Scheijen J L J M, et al. Methylglyoxal-derived advanced glycation endproducts accumulate in multiple sclerosis lesions [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 855.
[6] Pinkas A, Aschner M. Advanced glycation end-products and their receptors: related pathologies, recent therapeutic strategies, and a potential model for future neurodegeneration studies [J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29(5): 707-714.
[7] Kurz A, Rabbani N, Walter M, et al. Alpha-synuclein deficiency leads to increased glyoxalase I expression and glycation stress [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(4): 721-733.
[8] Itoh Y, Esaki T, Shimoji K, et al. Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia *in vitro* and on glucose utilization by brain *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(8): 4879-4884.
[9] Orihuela R, McPherson C A, Harry G J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(4): 649-665.
[10] Kelly B, Onett L A. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity [J]. *Cell Res*, 2015, 25 (7): 771-784.
[11] Ding B, Lin C, Liu Q, et al. Tanshinone IIA attenuates neuroinflammation *via* inhibiting RAGE/NF-κB signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 302.
[12] Uribarri J, Cai W J, Peppas M, et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2007, 62(4): 427-433.
[13] Li R, Cai L, Xie X F, et al. 7, 3'-dimethoxy hesperetin inhibits inflammation by inducing synovial apoptosis in rats with adjuvant-induced arthritis [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(1): 139-146.
[14] Lin Z, Fu C C, Yan Z J, et al. The protective effect of hesperetin in osteoarthritis: an *in vitro* and *in vivo* study [J]. *Food Funct*, 2020, 11(3): 2654-2666.
[15] Omrani M, Keshavarz M, Nejad Ebrahimi S, et al. Potential natural products against respiratory viruses: a perspective to

- develop anti-COVID-19 medicines [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 586993.
- [16] Itoh K, Masuda M, Naruto S, et al. Antiallergic activity of unripe *Citrus hassaku* fruits extract and its flavanone glycosides on chemical substance-induced dermatitis in mice [J]. *J Nat Med*, 2009, 63(4): 443-450.
- [17] Zhang J X, Lei H B, Hu X, et al. Hesperetin ameliorates DSS-induced colitis by maintaining the epithelial barrier via blocking RIPK3/MLKL necroptosis signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 873: 172992.
- [18] Muhammad T, Ikram M, Ullah R, et al. Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF- κ B signaling [J]. *Nutrients*, 2019, 11(3): 648.
- [19] 赵玉升, 张 盈, 程国良, 等. 荆防颗粒对脂多糖致小鼠急性肺损伤的预防和保护作用[J]. *世界中医药*, 2023, 18(19): 2739-2745; 2751.
- [20] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, et al. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM[®]), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D789-D798.
- [21] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards Suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1-33.
- [22] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [23] Wishart D S, Feunang Y D, Guo A C, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1074-D1082.
- [24] Wang X, Shen Y H, Wang S W, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W356-W360.
- [25] Fang S S, Dong L, Liu L, et al. HERB: a high-throughput experiment- and reference-guided database of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1197-D1206.
- [26] Wang Y X, Zhang S, Li F C, et al. Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D1031-D1041.
- [27] Gilson M K, Liu T Q, Baitaluk M, et al. BindingDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D1045-D1053.
- [28] Gaulton A, Hersey A, Nowotka M, et al. The ChEMBL database in 2017 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D945-D954.
- [29] The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(5): 2699.
- [30] Szklarczyk D, Gable A L, Nastou K C, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-D612.
- [31] Zhou Y Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
- [32] Liu C Y, Yang Y, Ju W N, et al. Emerging roles of astrocytes in neuro-vascular unit and the tripartite synapse with emphasis on reactive gliosis in the context of Alzheimer's disease [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 193.
- [33] Kronenberg J, Pars K, Brieskorn M, et al. Fumaric acids directly influence gene expression of neuroprotective factors in rodent microglia [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 325.
- [34] Subhramanyam C S, Wang C, Hu Q D, et al. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 94: 112-120.
- [35] Nizami S, Hall-Roberts H, Warriar S, et al. Microglial inflammation and phagocytosis in Alzheimer's disease: Potential therapeutic targets [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(18): 3515-3532.
- [36] Chen X L, Wei W, Li Y Z, et al. Hesperetin relieves cisplatin-induced acute kidney injury by mitigating oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 308: 269-278.
- [37] Zhu X, Zhang Y M, Zhang M Y, et al. Hesperetin ameliorates diabetes-associated anxiety and depression-like behaviors in rats via activating Nrf2/ARE pathway [J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(7): 1969-1983.
- [38] Ebeqboni V J, Balahmar R M, Dickenson J M, et al. The effects of flavonoids on human first trimester trophoblast spheroidal stem cell self-renewal, invasion and JNK/p38 MAPK activation: Understanding the cytoprotective effects of these phytonutrients against oxidative stress [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 164: 289-298.
- [39] Liu Y, Zhang Y Y, Zheng X, et al. Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 112.
- [40] Gage M C, Thippeswamy T. Inhibitors of Src family kinases, inducible nitric oxide synthase, and NADPH oxidase as potential CNS drug targets for neurological diseases [J]. *CNS Drugs*, 2021, 35(1): 1-20.
- [41] Simpson D S A, Oliver P L. ROS generation in microglia: understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(8): 743.
- [42] Lüth H J, Ogunlade V, Kuhla B, et al. Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains [J]. *Cereb Cortex*, 2005, 15(2): 211-220.
- [43] Lue L F, Walker D G, Brachova L, et al. Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism [J]. *Exp Neurol*, 2001, 171(1): 29-45.