

[doi: 10.3969/j.issn.1006-7795.2022.01.017]

· 基础研究 ·

根皮素抑制 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞氧化应激反应

李琛琛 徐君美 贺芊芊 李嘉赢 李志恒 徐志卿 杨予涛*

(首都医科大学基础医学院神经生物学系,北京 100069)

【摘要】 目的 探讨根皮素(phloretin, PHL)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)导致的 BV2 小胶质细胞的氧化应激损伤的抑制作用及可能的分子机制。方法 利用 LPS 建立 BV2 小胶质细胞的氧化应激损伤模型,对该模型予以不同浓度的 PHL 预处理。利用 MTS 方法检测细胞活力。ELISA 法检测氧化应激相关产物一氧化氮(nitric oxide, NO)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性。双荧光素酶活性检验方法检测抗氧化响应元件荧光素酶报告基因质粒(antioxidant reaction element luciferase reporter plasmid, ARE-LUC)报告基因转录活性。Western blotting 法检测磷酸化核因子-E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)和血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)蛋白表达。结果 与对照组相比, LPS 处理后的 BV2 小胶质细胞活力显著降低,氧化应激产物 NO 和 MDA 水平明显升高, GSH 含量和 SOD 活性明显下降,但 Nrf2 磷酸化水平、ARE-LUC 报告基因转录活性和 HO-1 蛋白表达略有增高。与模型组比较,高剂量 PHL(20 μ mol/L)预处理明显改善 LPS 导致的 BV2 小胶质细胞活力下降,降低 NO 和 MDA 的含量,增高 GSH 的含量和 SOD 的活性,且进一步增加了 Nrf2 的磷酸化水平,上调 ARE-LUC 的转录活性和 HO-1 蛋白的表达。结论 PHL 可以显著抑制 LPS 导致的 BV2 小胶质细胞的氧化应激损伤, Nrf2/ARE 通路可能是根皮素发挥抑制 BV2 小胶质细胞氧化应激损伤作用的途径之一。

【关键词】 根皮素; BV2 小胶质细胞; 氧化应激; 核因子-E2 相关因子; 抗氧化响应元件

【中图分类号】 R739.41 **【文献标识码】** A

Phloretin inhibits oxidative stress response in LPS-stimulated BV2 microglia

Li Chenchen, Xu Junmei, He Qianqian, Li Jiaying, Li Zhiheng, Xu Zhiqing, Yang Yutao*

(Department of Neurobiology, School of Basic Medical Science, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the inhibition effect of phloretin (PHL) on oxidative stress response in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV2 microglia and its related molecular mechanism. **Methods** LPS was used to establish BV2 microglia oxidative stress damage cell model, and the cell model was pretreated with different concentrations of PHL. MTS assay was used to examine the cell survival rate of BV2 microglia. ELISA kits were used to detect oxidative stress related products such as nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and superoxide dismutase (SOD) activity. Luciferase reporter gene system was used to determine the transcriptional activity of antioxidant reaction element luciferase reporter plasmid (ARE-LUC). Western blotting was used to detect the level of phosphorylated nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) protein. **Results** LPS treatment significantly decreased the viability of BV2 microglia, the level of GSH and the activity of SOD, but increased the level of NO, MDA. However, the pretreatment of PHL remarkably increased the viability of BV2 microglia and the level of GSH and SOD, but decreased the level of NO and MDA. Meanwhile, the pretreatment of PHL further increased the level of phosphorylated Nrf2, the activity of ARE-LUC reporter gene and the level of HO-1. **Conclusion** PHL can significantly inhibit the oxidative stress response of BV2 microglia induced by LPS, and the inhibition effect might be mediated activating the Nrf2/ARE pathway.

【Key words】 phloretin; BV2 microglia; oxidative stress; nuclear factor E2-related factor; antioxidant response element

抑郁症是一种高发病率的情感类精神疾病,且具有很强的致残性和复发性^[1-2],如果不予以及时干预可严重影响患者的生活质量,甚至导致其自杀、自伤行为的产生^[3-4]。

研究^[5-6]显示,小胶质细胞在应激状态下的过度

激活可释放大量活性氧等氧化应激产物,可引起神经元的凋亡或坏死^[7-8]。相关临床和动物研究^[9-10]显示,脑内小胶质细胞的过度激活及相关氧化应激产物的水平与焦虑、抑郁样行为的发生密切相关,而予以抗氧化应激治疗则可在一定程度上改善其抑郁

基金项目:国家自然科学基金(8207052177)。This study was supported by National Natural Science Foundation of China (8207052177).

* Corresponding author, E-mail: yutaoy@cemu.edu.cn

网络出版时间:2022-01-16 网络出版地址:

症状^[11-12]。

核因子-E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件 (antioxidant reaction element, ARE) 信号通路是调节小胶质细胞激活并抑制其产生氧化应激产物的重要信号通路。当发生氧化应激时即可引起 Nrf2 发生磷酸化,磷酸化的 Nrf2 向细胞核内迁移并与抗氧化基因启动子的 ARE 顺式作用元件结合,增高抗氧化基因的表达,抑制氧化应激反应,进而避免细胞的损伤凋亡^[13-15]。已有研究^[16-18]表明激活 Nrf2/ARE 信号通路,可明显抑制抑郁动物情绪相关脑区氧化应激产物释放,减少神经元的损伤和凋亡而发挥抗抑郁的作用。

目前抑郁症在临床上主要通过选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物 (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs) 进行治疗。研究^[19-21]表明当前使用的抗抑郁药物虽然能改善部分患者的抑郁症状,但仍有较多的不良反应和禁忌证。因此,探索低不良反应、高经济性和安全性的化合物对抑郁的治疗具有重要的意义。

根皮素 (phloretin, PHL) 是一种来源于多汁水果果皮和根皮中的黄酮类化合物。目前,PHL 已被美国食用香料与提取物制造者协会 (Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States, FEMA) 列为公认安全物质 (generally recognized as safe, GRAS)。PHL 易于提取,经济成本较低^[22]。已有研究^[23]表明 PHL 能够通过抗氧化应激发挥肝保护作用,但是 PHL 能否抑制小胶质细胞激活后的氧化应激反应及相关的分子机制仍待进一步阐明。因此,本研究通过脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的氧化应激损伤的细胞模型,探讨 PHL 是否通过影响 Nrf2/ARE 信号通路从而抑制 BV2 小胶质细胞的过度氧化应激,相关研究为 PHL 的神经保护作用提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PHL (北京洪湖联合化工公司); LPS (美国 Sigma 公司); MTS 检测试剂盒 (美国 Promega 公司); 一氧化氮 (nitric oxide, NO)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) NO、MDA、SOD、GSH 检测试剂盒 (中国索莱宝公司); 脂质体 3000 转染试剂 (美国 In-

vitrogen 公司); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (美国 Promega 公司); 磷酸化 Nrf2 抗体 (中国 Bioss 公司); HO-1 抗体、 β -actin 抗体 (中国 Proteintech 公司); IRDye 680RD 和 RDye 800CW 荧光二抗 (中国 Life 公司); 抗氧化反应元件荧光素酶报告基因质粒 (中国吉满生物科技公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 BV2 小胶质细胞培养

BV2 小胶质细胞为本实验室冻存,复苏后使用 F12/DMEM 培养基加入 10% (体积分数) 胎牛血清在 37 °C, 5% (体积分数) CO₂ 培养箱中进行培养,隔天换液,每隔 2 d 传代,显微镜下观察细胞的形态,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.2 实验分组

待 BV2 小胶质细胞进入对数生长期后,将其分为 6 个组分别为: ①对照组 (Control); ②LPS 处理组 (LPS); ③LPS + 1 μ mol/L PHL 预保护组 [PHL (1 μ mol/L) + LPS]; ④LPS + 10 μ mol/L PHL 预保护组 [PHL (10 μ mol/L) + LPS]; ⑤LPS + 20 μ mol/L PHL 预保护组 [PHL (20 μ mol/L) + LPS]; ⑥20 μ mol/L PHL 处理组 [PHL (20 μ mol/L)], 对照组不作处理,模型组给予 LPS (100 ng/mL) 24 h, PHL 预保护组给予低、中、高浓度 PHL 12 h 后,给予 LPS 24 h, PHL (20 μ mol/L) 组给予 PHL 36 h。Nrf2 磷酸化是 Nrf2 发生核转移,发挥抗氧化作用的关键步骤。将 BV2 小胶质细胞分为如下 4 个组: 对照组、LPS 处理组、LPS + 10 μ mol/L PHL 组、LPS + 20 μ mol/L PHL 组。本研究选择具有明显保护效果的根皮素预处理浓度进行后续的双荧光素酶活性检测和 Western blotting 实验。

1.2.3 MTS 细胞活性检测

上述 6 组细胞各处理结束后,弃去旧培养基,每孔加入 100 μ L 含 20 μ L 96 孔细胞增生检测试剂完全培养基,在 37 °C, 5% (体积分数) CO₂ 的环境下孵育 2 h 后,酶标仪于 490 nm 读取吸光值。

1.2.4 BV2 小胶质细胞中 NO、MDA、GSH 和 SOD 活性检测

上述各组细胞处理结束后,收集细胞培养上清,收集各组细胞,按照试剂盒的操作说明按步骤加入试剂盒中所提供的试剂,结果根据标准溶液的浓度与吸光度绘制的标准曲线或说明书中提供的计算公式含量测定各组 NO、MDA、GSH 含量以及 SOD 活性。

1.2.5 双荧光素酶活性检测

各组细胞处理结束后每孔加入 100 μL 细胞裂解液于摇床上裂解 20 min,取 30 μL 细胞裂解液加入 30 μL 荧光素酶检测试剂,使用光度检测仪测定读数记为荧光值 1,再加入 30 μL 反应终止液测定读数记为荧光值 2,以荧光值 1/荧光值 2 的比值作为相对荧光素酶活性。

1.2.6 Western blotting 法检测

各处理组细胞加入 100 μL 裂解液,裂解,离心,收集上清,检测蛋白浓度。使用 10% (质量分数) PAGE 胶进行电泳,再以 300 mA,90 min 进行湿转,湿转后将 PVDF 膜用 10% (质量分数) 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 缓冲液洗膜 5 min \times 3 次。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,一抗(1:1 000)孵育过夜, TBST 缓冲液洗膜 5 min \times 3 次后,加入二抗(1:10 000),室温孵育 2 h 后,扫膜。使用图像处理软件 Image J 对蛋白条带的灰度值读数,以 β -actin 作为内参,与内参灰度值读数相比,计算各处理组比值占正常对照组比值的倍数。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 软件进行数据分析,结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据组间差异采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Tukey 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 PHL 预处理可改善 LPS 导致的 BV2 小胶质细胞活力降低

与对照组相比,LPS 处理组其 BV2 小胶质细胞活力比值为 0.70 ± 0.05 ,明显降低 ($P < 0.001$)。PHL (1 $\mu\text{mol/L}$) + LPS 组为 0.80 ± 0.06 ; PHL (10 $\mu\text{mol/L}$) + LPS 组为 0.85 ± 0.04 ; PHL (20 $\mu\text{mol/L}$) + LPS 组为 0.94 ± 0.06 ,PHL 可在一定程度改善 LPS 导致的 BV2 小胶质细胞活力下降 ($P < 0.01$);随着 PHL 浓度升高,BV2 小胶质细胞活力也随之增加,PHL 的保护作用具有一定的浓度依赖性。此外,PHL (20 $\mu\text{mol/L}$) 组为 0.95 ± 0.04 ,与对照组相比,单独予以 20 $\mu\text{mol/L}$ PHL 处理并未引起 BV2 小胶质细胞活力出现明显改变,差异无统计学意义 ($P > 0.05$, $n = 5$, 图 1)。

2.2 PHL 预处理可降低 LPS 导致的 BV2 小胶质细胞 NO、MDA 浓度升高

正常对照组细胞上清中 NO 浓度为 (3.30 ± 0.72) $\mu\text{mol/L}$,细胞内 MDA 浓度为 (0.42 ± 0.03) nmol/mg,

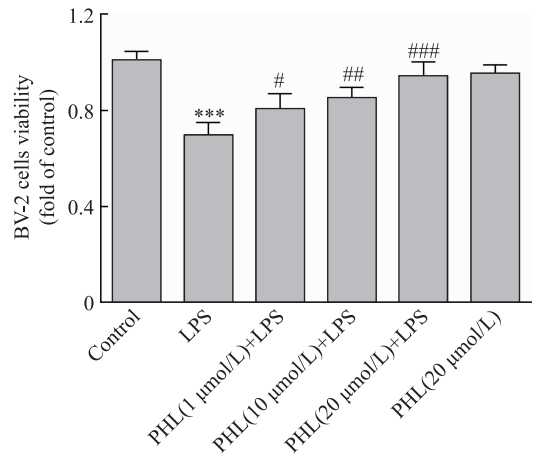


图1 PHL 预处理可改善 LPS 导致的 BV2 小胶质细胞活力降低

Fig. 1 PHL pretreatment improves the decreased viability of BV2 microglia cells induced by LPS

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs LPS group, $n = 5$; PHL: phloretin; LPS: lipopolysaccharide.

LPS 处理组 NO 浓度为 (8.15 ± 0.39) $\mu\text{mol/L}$, MDA 浓度为 (0.95 ± 0.07) nmol/mg,与对照组相比,NO、MDA 浓度显著增加 ($P < 0.001$)。PHL (1 $\mu\text{mol/L}$) + LPS 组 NO 浓度为 (3.42 ± 0.33) $\mu\text{mol/L}$, MDA 浓度为 (0.54 ± 0.08) nmol/mg; PHL (10 $\mu\text{mol/L}$) + LPS 组 NO 浓度为 (2.73 ± 0.39) $\mu\text{mol/L}$, MDA 浓度为 (0.47 ± 0.05) nmol/mg; PHL (20 $\mu\text{mol/L}$) + LPS 组 NO 浓度为 (2.60 ± 0.81) $\mu\text{mol/L}$, MDA 浓度为 (0.46 ± 0.05) nmol/mg,与 LPS 处理组相比,PHL 可在一定程度抑制 LPS 导致的 BV2 小胶质细胞上清中 NO 的浓度、细胞内 MDA 浓度升高 ($P < 0.01$) 且 PHL 的抑制作用存在一定的浓度依赖性。此外,PHL (20 $\mu\text{mol/L}$) 组上清中 NO 浓度为 (2.57 ± 0.44) $\mu\text{mol/L}$, MDA 浓度为 (0.42 ± 0.02) nmol/mg,与对照组相比,单独予以 20 $\mu\text{mol/L}$ PHL 处理,并未引起细胞上清中 NO 浓度、细胞内 MDA 浓度出现明显改变,差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2)。

2.3 PHL 预处理可改善 LPS 导致的 BV2 小胶质细胞内 GSH 及 SOD 活性浓度降低

正常对照组细胞 GSH 浓度为 (23.66 ± 1.32) $\mu\text{g}/\text{mg}$, SOD 活性为 (18.03 ± 1.52) U/mg, LPS 处理组 GSH 浓度为 (18.01 ± 0.49) $\mu\text{g}/\text{mg}$, SOD 活性为 (9.33 ± 0.37) U/mg,与对照组相比,LPS 处理组 GSH、SOD 活性浓度明显降低 ($P < 0.001$)。PHL (1 $\mu\text{mol/L}$) + LPS 组 GSH 浓度为 (21.76 ± 0.40) g/mg, SOD 活性为 (12.41 ± 0.63) U/mg; PHL (10 $\mu\text{mol/L}$) + LPS 组细胞 GSH 浓度为

(22.48 ± 0.40) $\mu\text{g}/\text{mg}$, SOD 活性为(14.74 ± 1.07) U/mg ; PHL($20 \mu\text{mol}/\text{L}$) + LPS 组细胞 GSH 浓度为(22.75 ± 0.50) $\mu\text{g}/\text{mg}$, SOD 活性为(18.70 ± 1.17) U/mg ; 与 LPS 处理组相比, PHL 可在一定程度改善 LPS 导致的 BV2 小胶质细胞内 GSH、SOD 活性浓度降低($P < 0.01$), 随着 PHL 浓度升高, PHL 的改善作用存在一定的浓度依赖性。此外, 单独予以 $20 \mu\text{mol}/\text{L}$ PHL 处理, 细胞内 GSH 浓度为(21.92 ± 1.50) $\mu\text{g}/\text{mg}$, SOD 活性为(20.44 ± 0.62) U/mg , 与对照组相比, BV2 小胶质细胞内 GSH、

SOD 活性浓度未出现明显改变($P > 0.05$, 图3)。

2.4 PHL 预处理可上调 BV2 小胶质细胞 Nrf2 蛋白的磷酸化水平

与对照组比较, LPS 处理组其 Nrf2 磷酸化水平相比于对照组为 1.95 ± 0.59 , 略有增加($P < 0.05$)。与 LPS 处理组比较, 给予不同浓度 PHL 预保护 12 h 后, PHL($10 \mu\text{mol}/\text{L}$) + LPS 组为 3.60 ± 0.85 , PHL($20 \mu\text{mol}/\text{L}$) + LPS 组为 3.89 ± 1.01 , PHL 可进一步上调 Nrf2 的磷酸化水平($P < 0.05$, 图4)。

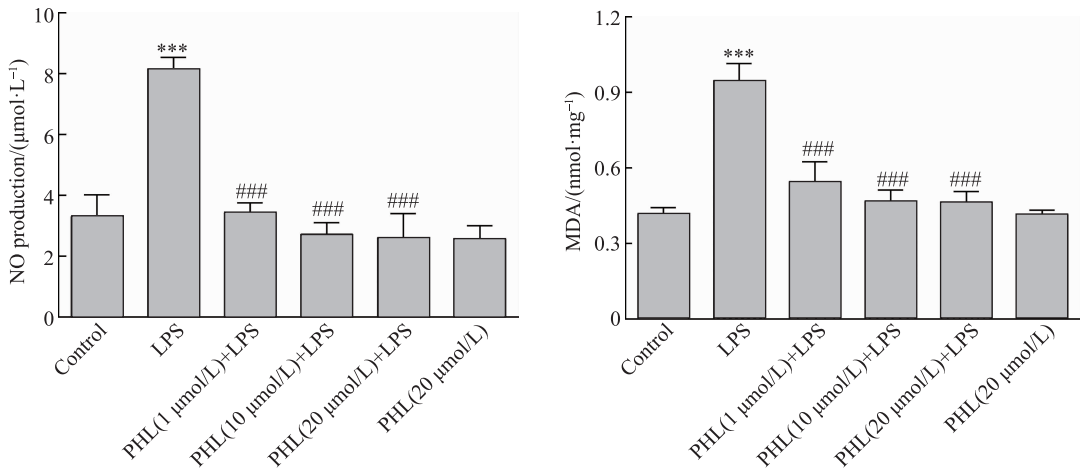


图2 PHL 预保护可降低 LPS 导致的 BV2 小胶质细胞 NO 及 MDA 水平升高

Fig. 2 PHL pretreatment reduced the increase of NO and MDA level induced by LPS in BV2 microglia

*** $P < 0.001$ vs control group, ### $P < 0.001$ vs LPS group; PHL: phloretin; LPS: lipopolysaccharide; NO: nitric oxide; MDA: malondialdehyde; $n = 3$.

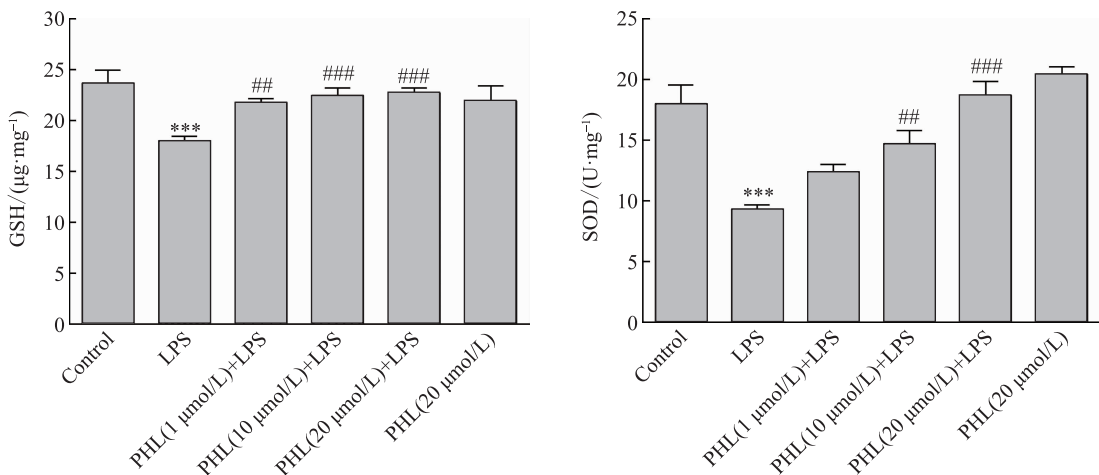


图3 PHL 预处理可改善 LPS 导致的 BV2 小胶质细胞内 GSH 及 SOD 活性浓度降低

Fig. 3 PHL pretreatment improved the decrease of GSH and SOD activity in BV2 microglia induced by LPS

*** $P < 0.001$ vs control group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs LPS group; PHL: phloretin; LPS: lipopolysaccharide; GSH: glutathione; SOD: superoxide dismutase; $n = 3$.

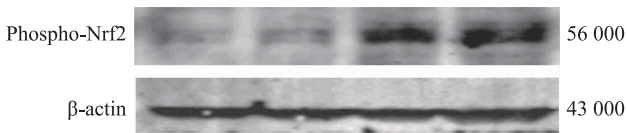
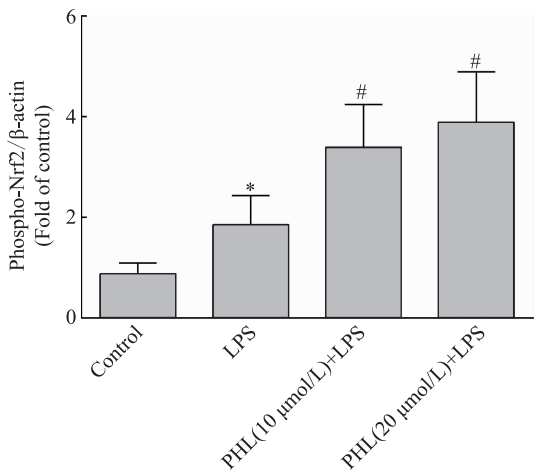


图 4 PHL 预处理可上调 BV2 小胶质细胞 Nrf2 蛋白的磷酸化水平

Fig. 4 PHL pretreatment increased the level of phosphorylated Nrf2 in BV2 microglia

* $P < 0.05$ vs control group, # $P < 0.05$ vs LPS group, $n = 3$; PHL: phloretin; LPS: lipopolysaccharide; Nrf2: nuclear factor E2-related factor 2.

2.5 PHL 预处理可上调 BV2 小胶质细胞 ARE-LUC 报告基因的转录活性

双荧光素酶报告基因检测结果显示,正常对照组 BV2 小胶质细胞相对荧光素酶活性为 31.24 ± 8.20 , LPS 处理组为 54.19 ± 5.31 , 相对荧光素酶活性略有上升 ($P < 0.05$)。与 LPS 处理组相比, PHL ($10 \mu\text{mol/L}$) + LPS 组为 89.44 ± 6.12 , PHL ($20 \mu\text{mol/L}$) + LPS 组为 107.20 ± 19.42 , PHL 可在一定程度上进一步上调相对荧光素酶活性,且上调作用存在一定的浓度依赖性 ($P < 0.05$, 图 5)。

2.6 PHL 预处理可上调 BV2 小胶质细胞 HO-1 蛋白水平

采用 Western blotting 法检测了各组细胞内 HO-1 蛋白表达水平。LPS 处理组 HO-1 蛋白表达水平相比于对照组比值为 1.80 ± 0.32 , LPS 处理组 HO-1 蛋白表达水平增加 ($P < 0.05$)。PHL ($10 \mu\text{mol/L}$) + LPS 组比值为 2.13 ± 0.24 , PHL ($20 \mu\text{mol/L}$) + LPS 组比值为 2.24 ± 0.32 , 与 LPS 处理组相比,给与不同浓度 PHL 预保护 12 h 后可进一步上调 HO-1 蛋白表达水平 ($P < 0.05$, 图 6)。

3 讨论

本研究首先建立了 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞

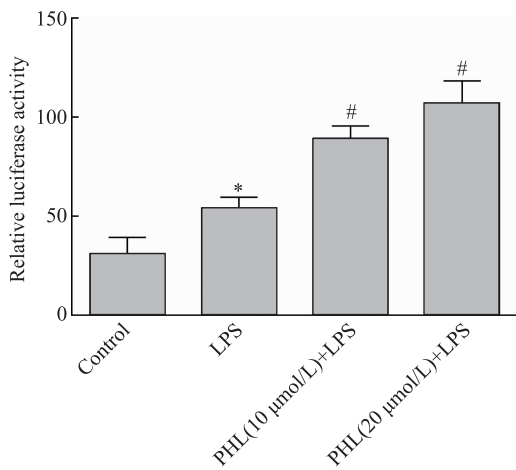


图 5 PHL 预处理可上调 BV2 小胶质细胞 ARE-LUC 报告基因转录活性

Fig. 5 PHL pretreatment increased the activity of ARE-LUC reporter gene

* $P < 0.05$ vs control group, # $P < 0.05$ vs LPS group; $n = 3$; PHL: phloretin; LPS: lipopolysaccharide; ARE-LUC: antioxidant reaction element luciferase reporter plasmid.

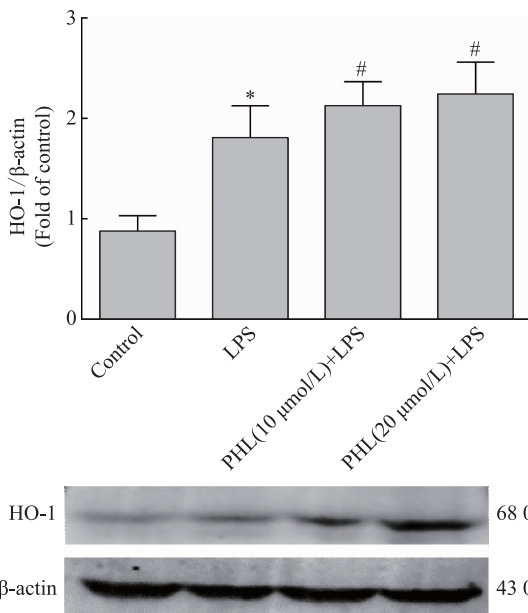


图 6 PHL 预处理可上调 BV2 小胶质细胞 HO-1 蛋白水平
Fig. 6 PHL pretreatment increased the level of HO-1 in BV2 microglia

* $P < 0.05$ vs control group, # $P < 0.05$ vs LPS group; $n = 3$; PHL: phloretin; HO-1: heme oxygenase-1; LPS: lipopolysaccharide.

氧化应激损伤模型。与既往报道^[24]一致。相关实验结果证明, LPS 是导致 BV2 小胶质细胞过度激活后产生大量氧化应激产物的重要介质, 该细胞的氧化应激模型适宜相关研究的展开。

本研究发现给与 BV2 小胶质细胞氧化应激损伤模

型 12 h 的 PHL 预处理,可以明显降低 LPS 导致的 BV2 小胶质细胞氧化应激产物的释放,且 PHL 的保护作用还存在一定的浓度依赖性。在中枢神经系统中,Zhang 等^[25] 研究结果显示,PHL 同样能够抑制神经系统炎症反应从而改善 MPTP 诱导小鼠产生的帕金森障碍。此外,还有研究^[26] 报道 PHL 能够改善高糖介导 H9c2 细胞的氧化应激与炎症反应损伤。上述研究结果表明在细胞水平上 PHL 确实具有一定的抗炎抗氧化作用,具有治疗抑郁症的潜在应用价值。

为了阐明 PHL 对 LPS 导致 BV2 小胶质细胞氧化应激损伤的保护作用的分子机制,本研究探讨了 PHL 对 Nrf2/ARE 信号通路的影响。LPS 处理 BV2 小胶质细胞后,Nrf2 蛋白磷酸化水平、HO-1 蛋白的表达也有一定程度的增高,结果与既往研究^[27-28] 结果一致,推测上述现象可能是 BV2 小胶质细胞对 LPS 处理的一种防御性代偿反应。当 BV2 小胶质细胞用 PHL 预处理后,可进一步得升高 Nrf2 蛋白磷酸化水平,上调 ARE 转录活性,增加 HO-1 蛋白表达,且 PHL 的上述作用还存在一定程度的浓度依赖性。以往研究^[29] 表明当细胞发生氧化应激时,稳定状态下的 Nrf2 发生磷酸化,解除与 Keap1 结合而由胞质向胞核转移,进入细胞核后识别并与 ARE 结合,启动 ARE 调控的多种抗氧化应激蛋白的基因转录发挥抗氧化应激的作用。在本研究中,利用 Western blotting 以及双荧光素活性检测证明 PHL 能够增高 Nrf2 磷酸化水平,上调 ARE 转录活性,增加 HO-1 蛋白的表达,暗示 Nrf2/ARE 通路可能是根皮素在发挥抗氧化应激的作用中的途径之一。

4 参考文献

[1] Jia Z Y, Huang X Q, Wu Q Z, et al. High-field magnetic resonance imaging of suicidality in patients with major depressive disorder[J]. *Am J Psychiatry*, 2010, 167(11): 1381-1390.

[2] GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016[J]. *Lancet*, 2017, 390(10100): 1211-1259.

[3] 秦碧勇, 戴立磊, 汪键, 等. 抑郁症患者自杀风险与共病数量、抑郁程度的相关性研究[J]. *重庆医学*, 2016, 45(13): 1810-1812.

[4] Rapaport M H, Clary C, Fayyad R, et al. Quality-of-life im-

pairment in depressive and anxiety disorders[J]. *Am J Psychiatry*, 2005, 162(6): 1171-1178.

[5] Wohleb E S, Hanke M L, Corona A W, et al. β -adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(17): 6277-6288.

[6] Stein D J, Vasconcelos M F, Albrechet-Souza L, et al. Microglial over-activation by social defeat stress contributes to anxiety- and depressive-like behaviors[J]. *Front Behav Neurosci*, 2017, 11: 207.

[7] Kudlow P, Cha D S, Carvalho A F, et al. Nitric oxide and major depressive disorder: pathophysiology and treatment implications[J]. *Curr Mol Med*, 2016, 16(2): 206-215.

[8] Grinberg Y Y, Dibbern M E, Levasseur V A, et al. Insulin-like growth factor-1 abrogates microglial oxidative stress and TNF- α responses to spreading depression[J]. *J Neurochem*, 2013, 126(5): 662-672.

[9] Brites D, Fernandes A. Neuroinflammation and depression: microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation[J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 476.

[10] Fedoce A D G, Ferreira F, Bota R G, et al. The role of oxidative stress in anxiety disorder: cause or consequence?[J]. *Free Radic Res*, 2018, 52(7): 737-750.

[11] Ramirez K, Sheridan J F. Antidepressant imipramine diminishes stress-induced inflammation in the periphery and central nervous system and related anxiety- and depressive-like behaviors[J]. *Brain Behav Immun*, 2016, 57: 293-303.

[12] 肖雪. 帕罗西汀联合参松养心胶囊治疗老年冠心病合并抑郁症疗效及对患者氧化/抗氧化应激平衡和生活质量的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(5): 481-484.

[13] Fu K Q, Feng C, Shao L Z, et al. Tanshinone IIA exhibits anti-inflammatory and antioxidative effects in LPS-stimulated bovine endometrial epithelial cells by activating the Nrf2 signaling pathway[J]. *Res Vet Sci*, 2021, 136: 220-226.

[14] Das R, Balmik A A, Chinnathambi S. Melatonin reduces GSK3 β -mediated tau phosphorylation, enhances Nrf2 nuclear translocation and anti-inflammation[J]. *ASN Neuro*, 2020, 12: 1759091420981204.

[15] Goodfellow M J, Borcar A, Proctor J L, et al. Transcriptional activation of antioxidant gene expression by Nrf2 protects against mitochondrial dysfunction and neuronal death associated with acute and chronic neurodegeneration[J]. *Exp Neurol*, 2020, 328: 113247.

[16] Abuezz S A, Hendawy N. Insights into the potential antidepressant mechanisms of cilostazol in chronically restraint rats: impact on the Nrf2 pathway[J]. *Behav Pharmacol*, 2018, 29

- (1): 28–40.
- [17] Tian L, Sun S S, Cui L B, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation elicits antidepressant- and anxiolytic-like effect via nuclear factor-E2-related factor 2-mediated anti-inflammation mechanism in rats[J]. *Neuroscience*, 2020, 429: 119–133.
- [18] Morris G, Walker A J, Walder K, et al. Increasing Nrf2 activity as a treatment approach in neuropsychiatry[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(5): 2158–2182.
- [19] 高贵元, 黄捷, 刘丹, 等. 抑郁症的发病机制及抗抑郁药物的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2021, 18(1): 52–55, 70.
- [20] Nørr L, Bennedsen B, Fedder J, et al. Use of selective serotonin reuptake inhibitors reduces fertility in men[J]. *Andrology*, 2016, 4(3): 389–394.
- [21] Ahmadimanes M, Balarastaghi S, Rashedinia M, et al. A systematic review on the genotoxic effect of serotonin and nor-epinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) antidepressants[J]. *Psychopharmacology*, 2020, 237(7): 1909–1915.
- [22] 魏丽娜, 赵静, 罗仓学, 等. 根皮素的制备、结构修饰及生理活性研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(17): 278–285.
- [23] Ren D Y, Liu Y F, Zhao Y, et al. Hepatotoxicity and endothelial dysfunction induced by high choline diet and the protective effects of phloretin in mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 94: 203–212.
- [24] Alvaríño R, Alonso E, Abbasov M E, et al. Gracilin A derivatives target early events in Alzheimer's disease: *in vitro* effects on neuroinflammation and oxidative stress[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(9): 4102–4111.
- [25] Zhang G J, Yang G Q, Liu J. Phloretin attenuates behavior deficits and neuro-inflammatory response in MPTP induced Parkinson's disease in mice[J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116600.
- [26] Ying Y, Jin J Y, Ye L, et al. Phloretin prevents diabetic cardiomyopathy by dissociating Keap1/Nrf2 complex and inhibiting oxidative stress[J]. *Front Endocrinol*, 2018, 9: 774.
- [27] 李兵, 张婵, 林芳, 等. 葛根素通过 Nrf2/ARE 通路调控小神经胶质 BV-2 细胞的氧化应激损伤[J]. *天津中医药*, 2018, 35(12): 943–946.
- [28] Kwon Y W, Cheon S Y, Park S Y, et al. Tryptanthrin suppresses the activation of the LPS-treated BV2 microglial cell line via Nrf2/HO-1 antioxidant signaling[J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 18.
- [29] Joshi G, Johnson J A. The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2012, 7(3): 218–229.

(收稿日期:2021-06-18)

编辑 慕 萌