

# 基于Notch1/Jagged1/Hes1通路探究木犀草素对实验性自身免疫性葡萄膜炎的治疗作用及机制

杨洁 吕旭东\* 程新潮 徐毅

(咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院眼科, 咸宁 437100)

**摘要** 该研究旨在探究木犀草素(Lut)对实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)的治疗作用及Notch1/Jagged1/Hes1通路的影响。将大鼠随机分为对照组(Control组), 模型组(Model组), 木犀草素低、中、高剂量组(Lut-L、Lut-M、Lut-H组), 木犀草素高剂量+Notch1通路激活剂组(Lut-H+JFC组)。除Control组外, 其余组均构建EAU大鼠模型。药物干预结束后, 通过裂隙灯显微镜观察眼部体征并进行临床评分; HE染色观察眼球组织病理变化; RT-qPCR法检测视网膜组织*IL-10*、*IL-17A*、*TNF- $\alpha$* 、*Arg1*、*iNOS*、*IFN- $\gamma$*  mRNA表达水平; 流式细胞术检测脾脏Treg和Th17细胞占比; 免疫组化法检测眼球组织Iba-1、Occludin、Claudin-1阳性表达情况; Western blot检测视网膜组织Notch1/Jagged1/Hes1通路蛋白表达量。该研究发现, EAU大鼠结膜血管扩张, 虹膜充血, 水肿, 眼部组织发生炎性损伤。视网膜组织*IL-17A*、*TNF- $\alpha$* 、*iNOS*和*IFN- $\gamma$*  mRNA相对表达水平, 脾脏Th17细胞比例, Th17/Treg值, Iba-1阳性表达水平, Notch1/Jagged1/Hes1通路蛋白表达水平明显升高, 然而*Arg1*、*IL-10* mRNA相对表达水平, 脾脏Treg细胞比例, Occludin、Claudin-1阳性表达水平降低( $P<0.05$ ); 低、中、高剂量Lut可减轻大鼠眼球组织炎性损伤, 并可降低视网膜组织*IL-17A*、*TNF- $\alpha$* 、*iNOS*和*IFN- $\gamma$*  mRNA相对表达水平, 脾脏Th17细胞比例, Th17/Treg值, Iba-1阳性表达水平, Notch1/Jagged1/Hes1通路蛋白表达水平, 同时可提高*Arg1*、*IL-10* mRNA相对表达水平, 脾脏Treg细胞比例, Occludin、Claudin-1阳性表达水平( $P<0.05$ ); 与Lut-H组相比, Lut-H+JFC组大鼠眼部组织炎性损伤加重, 脾脏Th17细胞比例及Th17/Treg值升高, 小胶质细胞向M1型极化, 血-视网膜屏障遭到破坏, Notch1/Jagged1/Hes1通路活性增强( $P<0.05$ )。综合以上结果可知, Lut可能通过调控Notch1/Jagged1/Hes1通路调节免疫稳态、减轻EAU大鼠眼球组织炎症反应、增强血-视网膜屏障保护功能。

**关键词** 木犀草素; 自身免疫性葡萄膜炎; 免疫稳态; Notch1/Jagged1/Hes1通路

## Exploring the Therapeutic Effect and Mechanism of Luteolin on Experimental Autoimmune Uveitis Based on the Notch1/Jagged1/Hes1 Pathway

YANG Jie, LÜ Xudong\*, CHENG Xinchao, XU Yi

(First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology/Ophthalmology Department of Xianning Central Hospital, Xianning 437100, China)

**Abstract** This study aimed to investigate the therapeutic effects of Lut (luteolin) on EAU (experimental autoimmune uveitis) and its impact on the Notch1/Jagged1/Hes1 signaling pathway. Rats were randomly divided

收稿日期: 2025-09-02

接受日期: 2025-12-25

湖北省卫生健康委员会面上项目基金(批准号: WJ2019M097)和2024年度咸宁市中心医院院级科研项目(批准号: 2024XYB022)资助的课题

\*通信作者。Tel: 13807249381, E-mail: y07dwx@163.com

Received: September 2, 2025

Accepted: December 25, 2025

This work was supported by the General Program of Hubei Provincial Health Commission (Grant No.WJ2019M097) and the Scientific Research Project of Xianning Central Hospital (Grant No.2024XYB022)

\*Corresponding author. Tel: +86-13807249381, E-mail: y07dwx@163.com

into Control group (control group), Model group (model group), Lut-L, Lut-M, and Lut-H group (low-, medium-, and high-dose luteolin groups), as well as Lut-H+JFC group (high-dose luteolin plus Notch1 pathway activator group). Except for the Control group, EAU rat models were established in all other groups. After drug intervention, ocular signs were observed and clinical scores were assessed using a slit-lamp microscope; histopathological changes in the eyeball were examined via HE staining; RT-qPCR was performed to measure the mRNA expression levels of *IL-10*, *IL-17A*, *TNF- $\alpha$* , *Arg1*, *iNOS*, and *IFN- $\gamma$*  in retinal tissues; the proportions of Treg and Th17 cells in the spleen were detected by flow cytometry; immunohistochemistry was used to evaluate the positive expression of Iba-1, Occludin, and Claudin-1 in ocular tissues; and Western blot was applied to determine the protein expression levels of the Notch1/Jagged1/Hes1 pathway in retinal tissues. The study found that EAU rats exhibited conjunctival vascular dilation, iris hyperemia, edema, and inflammatory damage in ocular tissues. The relative mRNA expression levels of *IL-17A*, *TNF- $\alpha$* , *iNOS*, and *IFN- $\gamma$*  in retinal tissues, the proportion of Th17 cells and the Th17/Treg ratio in the spleen, the positive expression of Iba-1, and the protein expression levels of the Notch1/Jagged1/Hes1 pathway were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Conversely, the relative mRNA expression levels of *Arg1* and *IL-10*, the proportion of Treg cells in the spleen, and the positive expression of Occludin and Claudin-1 were decreased ( $P < 0.05$ ). Low-, medium-, and high-dose Lut administration ameliorated inflammatory damage in rat ocular tissues, reduced the relative mRNA expression levels of *IL-17A*, *TNF- $\alpha$* , *iNOS*, and *IFN- $\gamma$*  in retinal tissues, lowered the proportion of Th17 cells and the Th17/Treg ratio in the spleen, decreased the positive expression of Iba-1 and the protein expression levels of the Notch1/Jagged1/Hes1 pathway, and increased the relative mRNA expression levels of *Arg1* and *IL-10*, elevated the proportion of Treg cells in the spleen, and enhanced the positive expression of Occludin and Claudin-1 ( $P < 0.05$ ). Compared with the Lut-H group, the Lut-H+JFC group showed aggravated inflammatory damage in ocular tissues, a higher proportion of Th17 cells and an increased Th17/Treg ratio in the spleen, polarization of microglia toward the M1 phenotype, disruption of the blood-retinal barrier, and enhanced activity of the Notch1/Jagged1/Hes1 pathway ( $P < 0.05$ ). Based on the comprehensive results, Lut may alleviate inflammatory responses in the ocular tissues of EAU rats, enhance the protective function of the blood-retinal barrier, and regulate immune homeostasis by modulating the Notch1/Jagged1/Hes1 signaling pathway.

**Keywords** luteolin; autoimmune uveitis; immune homeostasis; Notch1/Jagged1/Hes1 pathway

自身免疫性葡萄膜炎 (autoimmune uveitis, AU) 是一种严重的致盲性眼病, 其特征是炎性细胞浸润视网膜以及感光的光感受器细胞受损<sup>[1]</sup>。目前, 临床上治疗 AU 的方法是使用皮质类固醇和免疫调节药物, 但长期使用会导致肝肾功能损伤, 因此需要了解 AU 的病理机制并寻求更安全、高效的治疗药物。近年来, 天然产物因其多靶点、低毒性的优势, 在免疫调节和炎症相关疾病中的应用受到广泛关注。木犀草素 (luteolin, Lut) 是一种黄酮类化合物, 具有显著的抗炎、抗氧化、免疫调节等生物学活性, 在自身免疫性疾病中展现出良好的治疗潜力。如 Lut 可通过调节 Tfh/Tfr 细胞和缓解氧化应激抑制毒性弥漫性甲状腺肿小鼠的疾病进展<sup>[2]</sup>。Lut 通过调节缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 alpha, HIF-1 $\alpha$ ) 通路抑制巨噬细胞氧化应激, 从而减轻狼疮性肾

炎<sup>[3]</sup>。此外 Lut 还可通过下调角膜组织炎症因子的表达减轻角膜炎大鼠组织损伤<sup>[4]</sup>。然而, Lut 对 AU 的治疗作用及具体分子机制尚未被完全阐明。Notch 通路在调控免疫细胞分化及炎症反应中发挥关键作用, 其中 Notch1 与配体 Jagged1 结合, 可激活下游信号转导, 通过调控靶基因 *Hes1* 的表达, 参与 T 细胞亚群分化、巨噬细胞活化等免疫过程<sup>[5]</sup>。研究表明, Notch 信号通路的激活与 AU 的发生发展密切相关<sup>[6]</sup>, 降低 Notch1/Jagged1/Hes1 通路活性可促进 M2 型巨噬细胞极化, 抑制 AU 进展<sup>[7]</sup>。目前关于 Lut 能否通过调节 Notch1/Jagged1/Hes1 通路减轻实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis, EAU) 的病理损伤还未有明确报道。EAU 作为模拟人类 AU 的经典动物模型, 其病理特征与人类疾病高度相似, 已被广泛用于葡萄膜炎的发病机制研究及药物

筛选<sup>[8]</sup>。本研究通过构建EAU大鼠模型,探究Lut对大鼠眼部组织炎症反应、组织损伤的影响以及对Notch1/Jagged1/Hes1通路的调控作用,旨在为AU的临床治疗提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 药品与试剂 木犀草素(批号: 441007)购自上海雅吉生物科技有限公司; Jagged1/FC嵌合蛋白(批号: 70399)购自美国MCE公司; 离子钙结合衔接分子1(ionic calcium binding molecule 1, Iba-1)、Occludin抗体、Claudin-1抗体(批号: 178846、216327、307692)购自英国Abcam公司; HE染色试剂盒、反转录试剂盒、RT-qPCR试剂盒(批号: G1121、RP1105、RP1100)购自北京索莱宝科技有限公司; 引物由北京擎科生物科技有限公司提供; Notch1、Jagged1、Hes1抗体(批号: 3608、2620、11988)购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.1.2 实验动物 7周龄、体质量为180~200 g的雌性Lewis大鼠购自中研子创生物科技有限公司,生产许可证号: SCXK(京) 2022-0010。大鼠饲养温度为21~24 °C、相对湿度为50%~65%。本实验经咸宁市中心医院动物伦理委员会审核批准(批号: 咸医伦字-K(2025)015号)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 建模及分组 将光感受器间维生素A结合蛋白和完全弗氏佐剂(含2.5 g/L灭活结核杆菌)充分乳化混合后,以200 μL的剂量注射于大鼠后肢足垫和尾部皮下<sup>[9]</sup>。免疫1周后,在裂隙灯下观察大鼠眼前节反应,根据Casp1评分确定造模成功。将模型大鼠随机分为对照组(Control组),模型组(Model组),木犀草素低、中、高剂量组(Lut-L、Lut-M、Lut-H组),

木犀草素高剂量+Notch1通路激活剂组(Lut-H+JFC组),每组12只。参考文献[4]及预实验结果,其中Lut-L、Lut-M、Lut-H组大鼠分别以5、10、20 g/L的Lut局部滴眼(50 μL),2次/天,连续1周。Lut-H+JFC组大鼠以20 g/L Lut滴眼、500 μg/kg JFC灌胃<sup>[10]</sup>。Control组和Model组大鼠给予等量生理盐水处理。

1.2.2 Caspi临床评分 末次给药结束后,使用裂隙灯显微镜观察大鼠眼前节体征变化并进行评分。0分: 正常; 0.5分: 虹膜轻度扩张; 1分: 中度扩张; 2分: 前房模糊; 3分: 前房不透明; 4分: 前房混浊。

1.2.3 眼部组织病理变化检测 处死大鼠,摘取完整眼球清洗后,将其放入4%多聚甲醛固定液中,4 °C固定24 h,按照常规操作方式进行乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋,切片(4 μm)。将组织切片脱蜡至水后放入苏木素染液中室温染色10 min,流水冲洗后浸入1%盐酸乙醇分化液中分化5 s,再放入0.5%氨水中浸泡30 s,最后放入伊红染液中室温染色3 min。经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片、晾干后,于光镜下观察并进行病理学评分。

1.2.4 RT-qPCR法检测基因表达水平 采集眼球视网膜组织,TRIzol法提取总RNA,检测浓度后依照反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,并以其为模版进行PCR扩增反应。20 μL反应体系包括10 μL SYBR Green混合液,上、下游引物各0.4 μL,2 μL cDNA模板,7.2 μL RNase-free水。反应程序: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸90 s(40个循环); 熔解曲线95 °C变性15 s, 60 °C退火1 min, 95 °C连续采集荧光信号15 s。以β-actin为内参,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法计算目的基因的相对表达水平。引物序列见表1。

1.2.5 流式细胞术检测脾脏Th17、Treg细胞比例

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	上游序列(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>IL-17A</i>	GTG CCT GAT GCT GTT GCT GCT A	GTG AAG TGG AAC GGT TGA GGT AGT C
<i>TNF-α</i>	CAC GCT CTT CTG TCT ACT GAA CTT C	CTT GGT GGT TTG TGA GTG TGA GG
<i>iNOS</i>	CTT GGA GCG AGT TGT GGA TTG TTC T	AAC CTC TGC CTG TGC GTC TCT T
<i>IFN-γ</i>	TAC ACG CCG CGT CTT GGT T	CTT TTG CCA GTT CCT CCA GAT AT
<i>Arg1</i>	CCA AGC CAA AGC CCA TAG AGA TTA TCG	TCA GCG GAG TGT TGA TGT CAG TGT
<i>IL-10</i>	CTG CTA TGT TGC CTG CTC TTA CTG	GGG TCT GGC TGA CTG GGA AG
<i>β-actin</i>	GCC TTC CTT CCT GGG TAT GG	AAT GCC TGG GTA CAT GGT GG

取各组大鼠脾脏置于无菌PBS中,破碎组织并通过细胞筛过滤后收集单细胞悬液。4 °C、350 ×g离心5 min后弃上清并重悬细胞,调整浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。Th17细胞检测:取1 mL细胞悬液体外刺激后,依次分别加入PE-Cy5抗CD4抗体(1:200)、固定破膜液、FITC抗IL-17A抗体(1:100),4 °C下避光孵育30 min, PBS重悬细胞后于流式细胞仪检测。Treg细胞检测:取1 mL细胞悬液依次分别加入PE-Cy5抗CD4和APC抗CD25抗体(1:200)、固定破膜液、PE抗Foxp3抗体(1:100),4 °C避光孵育30 min, PBS重悬后上机检测。

**1.2.6 免疫组化法检测Iba-1、Occludin和Claudin-1阳性表达情况** 取“1.2.3”切片经脱蜡水化后放入柠檬酸盐抗原修复液中进行高温抗原修复,将切片放入3%过氧化氢溶液中室温避光孵育15 min,滴加5% BSA封闭液覆盖组织,37 °C恒温孵育30 min。随后与兔源Iba-1、Occludin和Claudin-1一抗(稀释比例均为1:500)4 °C孵育过夜,次日冲洗切片后滴加HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(1:1 000)室温孵育30 min, DAB显色、苏木精复染,脱水封片后于光镜下观察。Image-Pro Plus软件分别分析目标蛋白阳性区域的平均光密度。

**1.2.7 Western blot检测Notch1/Jagged1/Hes1通路蛋白表达情况** 分离眼球视网膜组织加入RIPA裂解液充分反应后匀浆,4 °C、12 000 ×g离心20 min,并取上清液。BCA法检测总蛋白浓度并调整至同一水平。将蛋白变性后取20 μg上样,经SDS-PAGE凝胶

电泳分离、转膜,用5%脱脂牛奶室温封闭1 h。随后分别加入兔源Notch1、Jagged1、Hes1、β-actin一抗(稀释比均为1:1 000),4 °C孵育过夜;次日加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(1:1 000),室温孵育2 h。可视化处理后,ImageJ软件对蛋白条带进行定量分析。

**1.2.8 统计学分析** 使用IBM SPSS Statistics 27.0对数据进行处理。计量资料符合正态分布以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行多组间比较,采用SNK-*q*检验进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Lut对EAU大鼠眼部临床评分的影响

Lut可减少EAU大鼠眼球病理变化。Model组相较于Control组,大鼠眼部结膜血管扩张、虹膜充血、水肿、粘连以及晶状体浑浊程度均加重,Caspi临床评分显著升高( $P < 0.05$ ); Lut-L、Lut-M、Lut-H组相较于Model组,眼部充血、水肿减轻,晶状体浑浊程度降低,Caspi临床评分显著降低( $P < 0.05$ ); Lut-H+JFC组相较于Lut-H组,眼部充血、水肿以及晶状体浑浊程度加重,Caspi临床评分显著升高( $P < 0.05$ )。见图1和图2。

### 2.2 Lut对EAU大鼠视网膜组织病理变化的影响

Lut可减轻大鼠视网膜组织病理损伤。Control组大鼠视网膜组织无病理变化;相较于Control组,

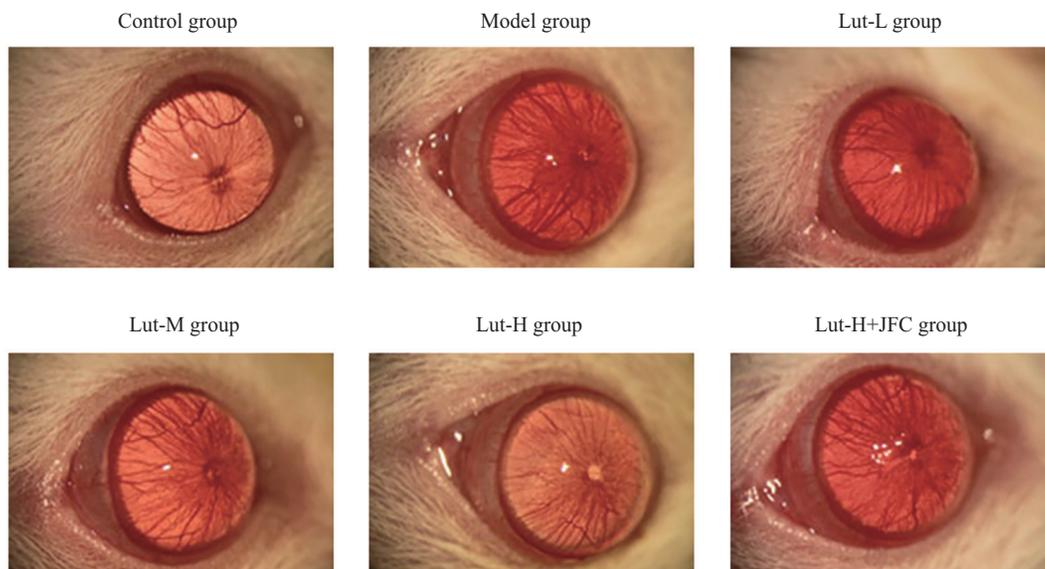
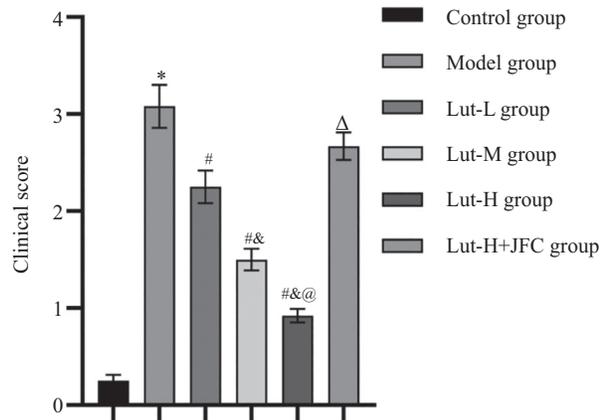


图1 裂隙灯显微镜观察大鼠眼前节体征变化

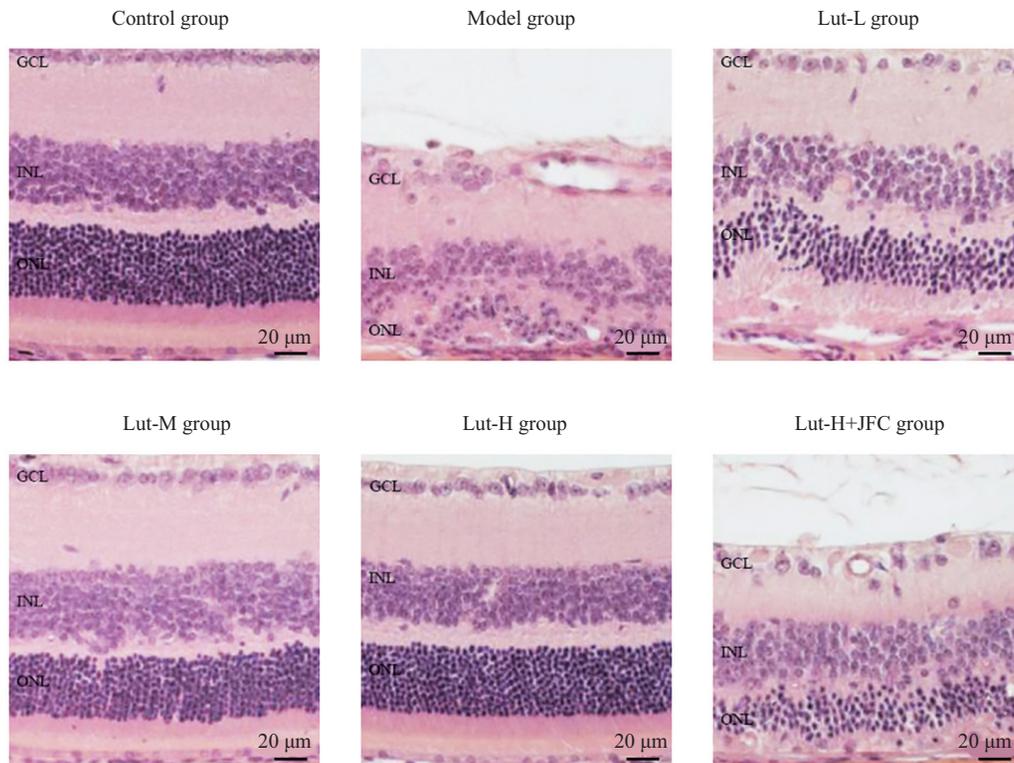
Fig.1 Observation of anterior segment signs in rats via slit lamp microscopy



\* $P < 0.05$ , 与Control组比较; # $P < 0.05$ , 与Model组比较; & $P < 0.05$ , 与Lut-L组比较; @ $P < 0.05$ , 与Lut-M组比较; Δ $P < 0.05$ , 与Lut-H组比较。  $n = 12, \bar{x} \pm s$ 。  
 \* $P < 0.05$  compared with the Control group; # $P < 0.05$  compared with the Model group; & $P < 0.05$  compared with the Lut-L group; @ $P < 0.05$  compared with the Lut-M group; Δ $P < 0.05$  compared with the Lut-H group.  $n = 12, \bar{x} \pm s$ .

图2 各组EAU大鼠临床评分比较

Fig.2 Comparison of clinical scores in EAU rats among different groups



GCL: 神经节细胞层; INL: 内核层; ONL: 外核层。

GCL: ganglion cell layer; INL: inner nuclear layer; ONL: outer nuclear layer.

图3 HE染色检测视网膜组织病理变化

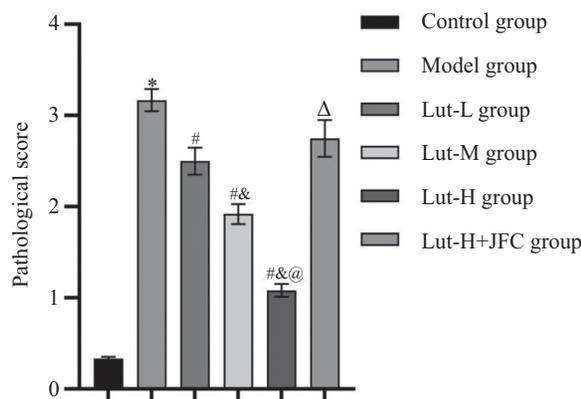
Fig.3 Pathological changes of retinal tissues detected by HE staining

Model组大鼠视网膜组织炎症细胞浸润、水肿及结构破坏程度加重, 病理评分显著升高 ( $P < 0.05$ ); 相较于Model组, Lut-L、Lut-M、Lut-H组大鼠视网膜组织炎症细胞浸润减少, 病理评分显著下降 ( $P < 0.05$ ); 相较于Lut-H组, Lut-H+JFC组大鼠视网膜组织炎症

损伤程度加重, 病理评分显著升高 ( $P < 0.05$ )。见图3和图4。

### 2.3 Lut对EAU大鼠视网膜组织相关指标表达的影响

Lut可减轻大鼠视网膜组织炎症反应。Model



\* $P < 0.05$ , 与Control组比较; # $P < 0.05$ , 与Model组比较; & $P < 0.05$ , 与Lut-L组比较; @ $P < 0.05$ , 与Lut-M组比较; Δ $P < 0.05$ , 与Lut-H组比较。  $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$ 。  
\* $P < 0.05$  compared with the Control group; # $P < 0.05$  compared with the Model group; & $P < 0.05$  compared with the Lut-L group; @ $P < 0.05$  compared with the Lut-M group; Δ $P < 0.05$  compared with the Lut-H group.  $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$ .

图4 各组大鼠视网膜组织病理评分比较

Fig.4 Comparison of pathological scores in retinal tissues of rats among different groups

组相较于Control组,大鼠 *IL-17A*、*TNF- $\alpha$* 、*iNOS*和 *IFN- $\gamma$*  mRNA表达显著上调, *Arg1*和 *IL-10* mRNA表达显著下调 ( $P < 0.05$ ); Lut-L、Lut-M、Lut-H组相较于Model组, *IL-17A*、*TNF- $\alpha$* 、*iNOS*和 *IFN- $\gamma$*  mRNA表达显著下调, *Arg1*和 *IL-10* mRNA表达显著上调 ( $P < 0.05$ ); Lut-H+JFC组相较于Lut-H组, *IL-17A*、*TNF- $\alpha$* 、*iNOS*和 *IFN- $\gamma$*  mRNA表达显著上调, *Arg1*和 *IL-10* mRNA表达显著下调 ( $P < 0.05$ )。见图5。

#### 2.4 Lut对EAU大鼠脾脏中Th17、Treg比例的影响

Lut可调节大鼠脾脏Th17/Treg细胞比例平衡。Model组相较于Control组,大鼠脾脏Treg细胞比例显著降低, Th17细胞比例及Th17/Treg值显著升高 ( $P < 0.05$ ); Lut-L、Lut-M、Lut-H组相较于Model组, Treg细胞比例显著升高, Th17细胞比例及Th17/Treg值显著降低 ( $P < 0.05$ ); Lut-H+JFC组相较于Lut-H组, Treg细胞比例显著降低, Th17细胞比例及Th17/Treg值显著升高 ( $P < 0.05$ )。见图6和图7。

#### 2.5 Lut对EAU大鼠视网膜组织Iba-1、Occludin和Claudin-1阳性表达的影响

Lut可抑制小胶质细胞活化并增强血-视网膜屏障保护功能。Model组相较于Control组,大鼠Iba-1阳性表达水平显著上升, Occludin和Claudin-1阳性表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); Lut-L、Lut-M、Lut-H组相较于Model组, Iba-1阳性表达水平显著降低, Occludin和Claudin-1阳性表达水平显著上升 ( $P < 0.05$ ); Lut-H+JFC组相较于Lut-H组, Iba-1阳性表达水平显著上升, Occludin和Claudin-1阳性表达水平显著降低

( $P < 0.05$ )。见图8和图9。

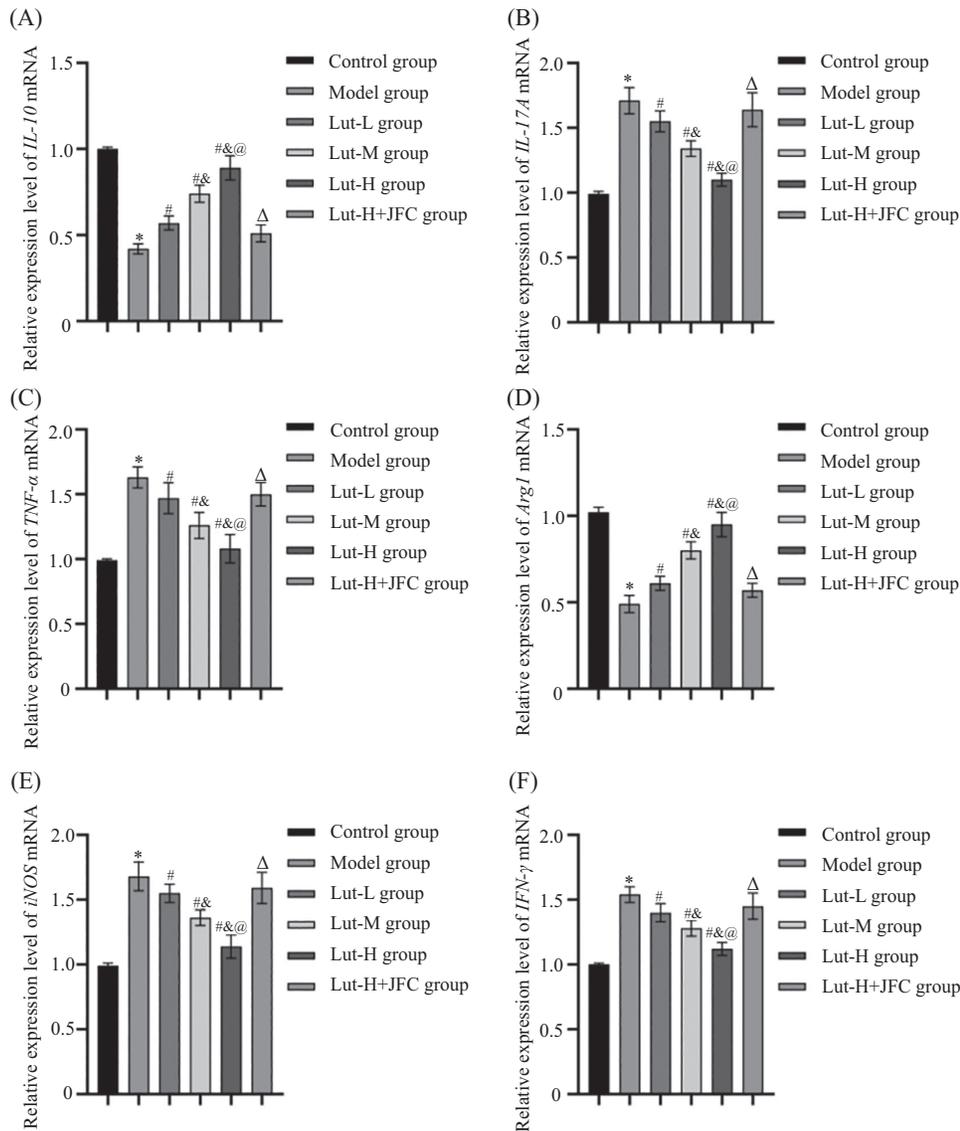
#### 2.6 Lut对EAU大鼠视网膜组织Notch1/Jagged1/Hes1通路蛋白表达的影响

Lut可抑制大鼠视网膜组织Notch1/Jagged1/Hes1通路蛋白的表达。Model组相较于Control组,大鼠Notch1/Jagged1/Hes1通路蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); Lut-L、Lut-M、Lut-H组相较于Model组, 各蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); Lut-H+JFC组相较于Lut-H组, 各蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。见图10和图11。

### 3 讨论

自身免疫性葡萄膜炎(AU)是导致视力严重损伤的眼部炎症性疾病。目前,临床针对AU的治疗以糖皮质激素和免疫抑制剂为主,但长期使用易引发眼压升高、白内障、感染风险增加等不良反应,且部分患者对现有治疗方案反应不佳,因此亟需探索安全有效的新型治疗策略及潜在作用靶点。

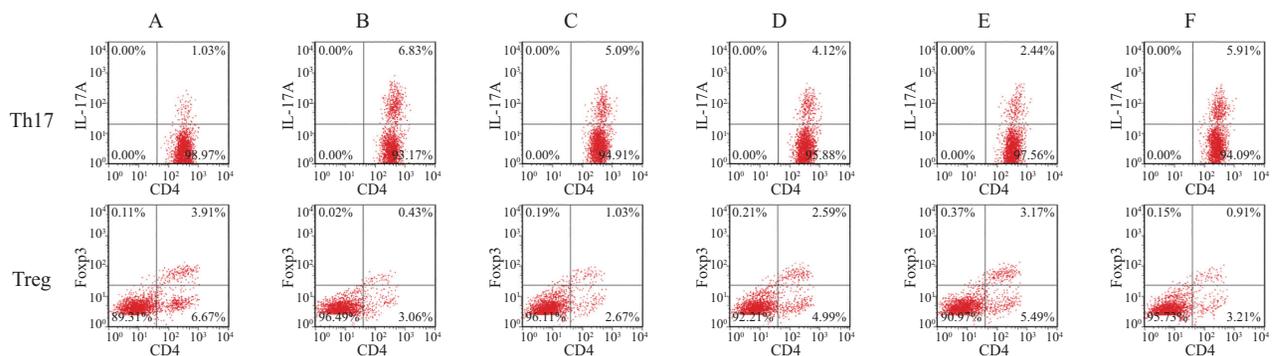
实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)的核心病理特征之一是视网膜、葡萄膜组织的自身免疫攻击,表现为T细胞为主的炎症细胞浸润、光感受器细胞损伤及视力丧失<sup>[11]</sup>。Th17细胞是一类以分泌IL-17A等促炎细胞因子为特征的CD4<sup>+</sup> T细胞亚群,可启动并放大眼部局部炎症反应。Treg细胞是维持免疫耐受的核心细胞,可通过分泌抗炎细胞因子抑制Th17细胞的活化<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,EAU大鼠脾脏Treg细胞比例降低, Th17细胞比例及Th17/Treg值升



\* $P < 0.05$ , 与Control组比较; # $P < 0.05$ , 与Model组比较; & $P < 0.05$ , 与Lut-L组比较; @ $P < 0.05$ , 与Lut-M组比较; Δ $P < 0.05$ , 与Lut-H组比较。  $n = 12, \bar{x} \pm s$ 。  
\* $P < 0.05$  compared with the Control group; # $P < 0.05$  compared with the Model group; & $P < 0.05$  compared with the Lut-L group; @ $P < 0.05$  compared with the Lut-M group; Δ $P < 0.05$  compared with the Lut-H group.  $n = 12, \bar{x} \pm s$ .

图5 各组大鼠视网膜组织相关指标表达水平对比

Fig.5 Comparison of expression levels of retinal tissue-related indicators in rats among different groups

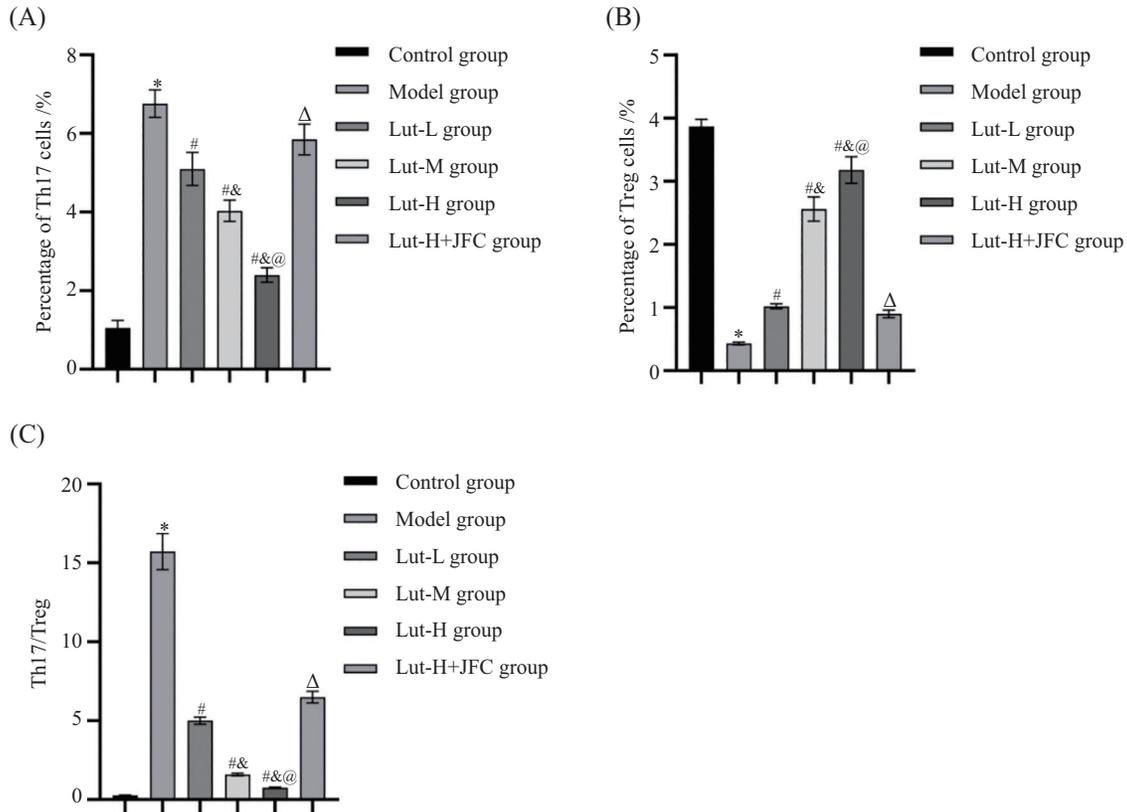


A: Control组; B: Model组; C: Lut-L组; D: Lut-M组; E: Lut-H组; F: Lut-H+JFC组。

A: Control group; B: Model group; C: Lut-L group; D: Lut-M group; E: Lut-H group; F: Lut-H+JFC group.

图6 流式细胞术检测Th17、Treg细胞比例

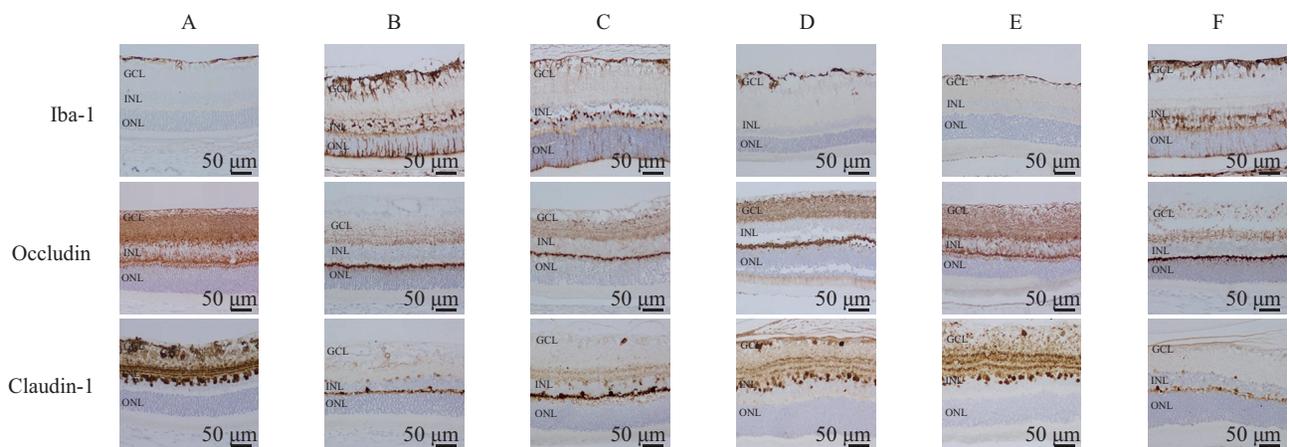
Fig.6 Detection of Th17 and Treg cell ratios via flow cytometry



\* $P < 0.05$ , 与Control组比较; # $P < 0.05$ , 与Model组比较; & $P < 0.05$ , 与Lut-L组比较; @ $P < 0.05$ , 与Lut-M组比较; Δ $P < 0.05$ , 与Lut-H组比较。  $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$ 。  
\* $P < 0.05$  compared with the Control group; # $P < 0.05$  compared with the Model group; & $P < 0.05$  compared with the Lut-L group; @ $P < 0.05$  compared with the Lut-M group; Δ $P < 0.05$  compared with the Lut-H group.  $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$ .

图7 各组大鼠脾脏中Th17、Treg比例及Th17/Treg值比较

Fig.7 Comparison of Th17, Treg proportions and Th17/Treg ratio in spleens of rats among different groups



A: Control组; B: Model组; C: Lut-L组; D: Lut-M组; E: Lut-H组; F: Lut-H+JFC组。GCL: 神经节细胞层; INL: 内核层; ONL: 外核层。

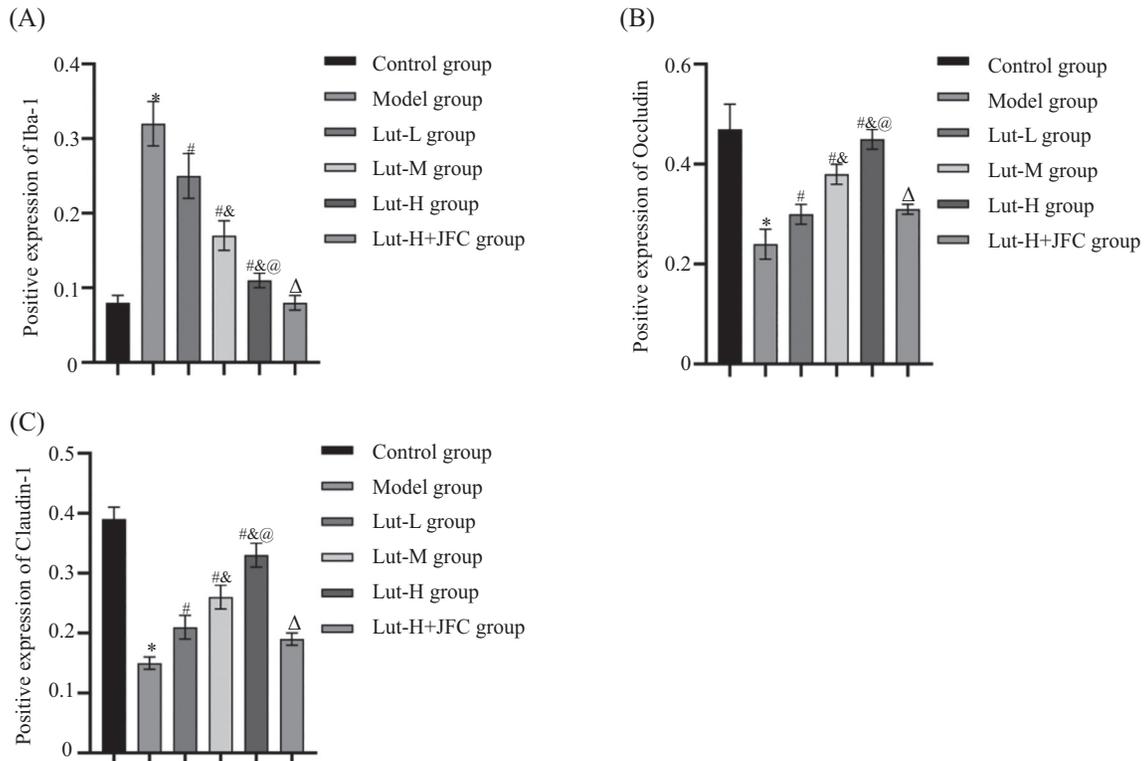
A: Control group; B: Model group; C: Lut-L group; D: Lut-M group; E: Lut-H group; F: Lut-H+JFC group. GCL: ganglion cell layer; INL: inner nuclear layer; ONL: outer nuclear layer.

图8 免疫组化法检测Iba-1、Occludin和Claudin-1阳性表达

Fig.8 Detection of Iba-1, Occludin and Claudin-1 positive expression by immunohistochemistry

高,表明大鼠发生全身性免疫紊乱,炎症反应增强。由自身反应性T细胞(如Th17)介导的EAU的病理进程与小胶质细胞极化状态密切相关<sup>[13]</sup>。离子钙结

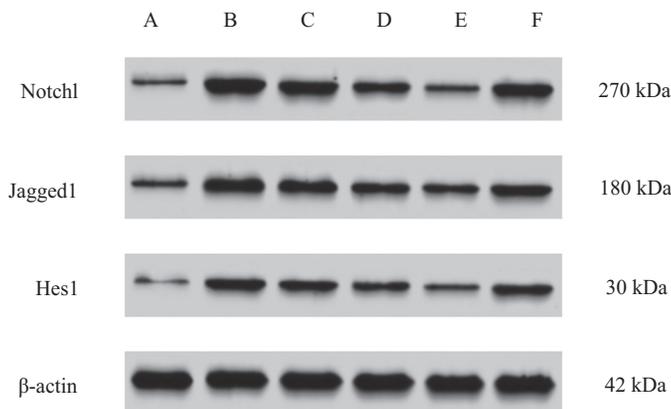
合适配分子1(Iba-1)特异性表达于小胶质细胞。在EAU动物模型中,小胶质细胞的极化状态直接影响眼部炎症的进展和视网膜组织损伤程度<sup>[14]</sup>。M1型



\* $P < 0.05$ , 与Control组比较; # $P < 0.05$ , 与Model组比较; & $P < 0.05$ , 与Lut-L组比较; @ $P < 0.05$ , 与Lut-M组比较; Δ $P < 0.05$ , 与Lut-H组比较。  $n = 12, \bar{x} \pm s$ 。  
 \* $P < 0.05$  compared with the Control group; # $P < 0.05$  compared with the Model group; & $P < 0.05$  compared with the Lut-L group; @ $P < 0.05$  compared with the Lut-M group; Δ $P < 0.05$  compared with the Lut-H group.  $n = 12, \bar{x} \pm s$ .

图9 各组大鼠Iba-1、Occludin和Claudin-1阳性表达比较

Fig.9 Comparison of Iba-1, Occludin and Claudin-1 positive expression in rats among different groups



A: Control组; B: Model组; C: Lut-L组; D: Lut-M组; E: Lut-H组; F: Lut-H+JFC组。

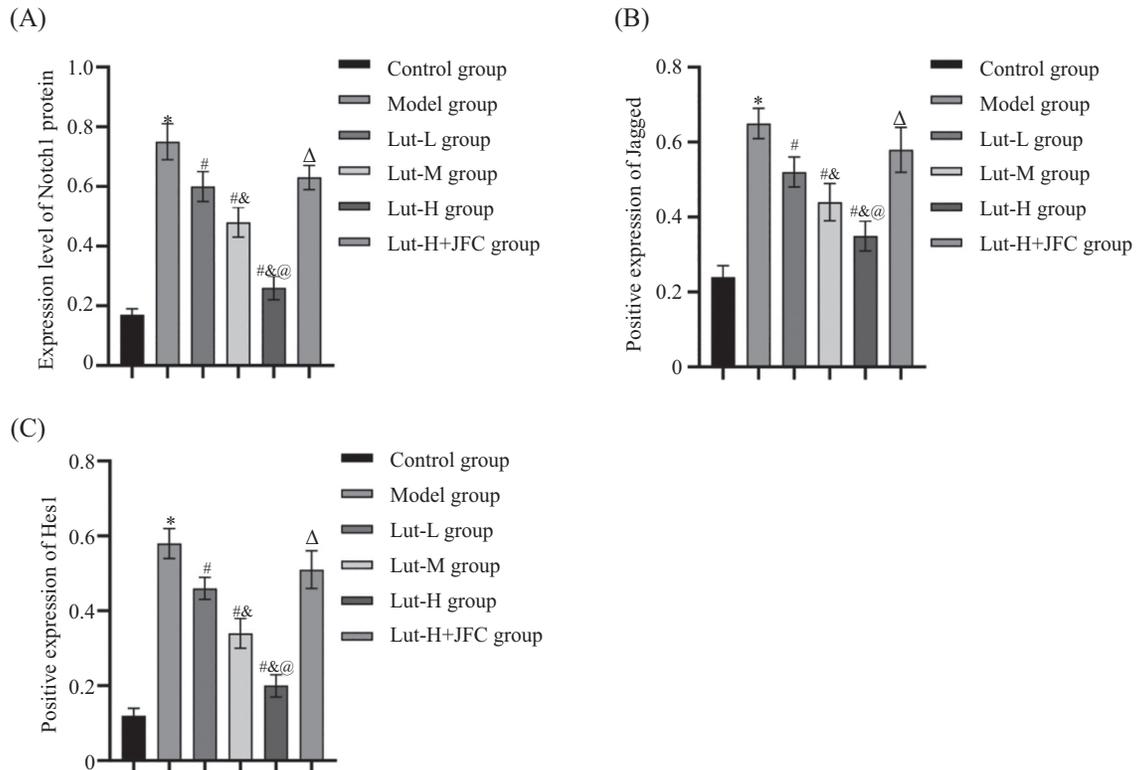
A: Control group; B: Model group; C: Lut-L group; D: Lut-M group; E: Lut-H group; F: Lut-H+JFC group.

图10 Western blot检测Notch1/Jagged1/Hes1通路蛋白表达情况

Fig.10 Detection of Notch1/Jagged1/Hes1 signaling pathway protein expression by Western blot

过度极化通过释放促炎因子、放大自身免疫反应加重视网膜损伤, 其中 iNOS 是 M1 型小胶质细胞标志物; M2 型极化则发挥抗炎作用, Arg1 是 M2 型小胶质细胞标志物。血-视网膜屏障破坏是 AU 的重要病理特征之一, 血-视网膜屏障可阻止外周免疫细胞、炎

症因子及大分子物质异常进入眼内, 是维持眼内免疫微环境的关键结构<sup>[15]</sup>。Occludin 和 Claudin-1 是两种关键的紧密连接蛋白, 主要分布于血管内皮细胞和视网膜色素上皮细胞, 是维持血-视网膜屏障完整性的核心分子<sup>[16]</sup>。本研究结果发现, EAU 大鼠 Iba-1



\* $P < 0.05$ , 与Control组比较; # $P < 0.05$ , 与Model组比较; & $P < 0.05$ , 与Lut-L组比较; @ $P < 0.05$ , 与Lut-M组比较; Δ $P < 0.05$ , 与Lut-H组比较。  $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$ 。  
\* $P < 0.05$  compared with the Control group; # $P < 0.05$  compared with the Model group; & $P < 0.05$  compared with the Lut-L group; @ $P < 0.05$  compared with the Lut-M group; Δ $P < 0.05$  compared with the Lut-H group.  $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$ .

图11 各组大鼠视网膜组织Notch1/Jagged1/Hes1通路蛋白表达情况比较

Fig.11 Comparison of Notch1/Jagged1/Hes1 signaling pathway protein expression in retinal tissues of rats among different groups

阳性表达水平及*iNOS* mRNA相对表达水平升高, Occludin和Claudin-1阳性表达水平降低, 视网膜炎性损伤加重, 表明小胶质细胞向M1型极化并促进大鼠机体炎症反应、加重血-视网膜屏障破坏。木犀草素(Lut)是一种具有抗炎和抗病毒特性的类黄酮, 具有靶向关键信号通路并减缓疾病进展的药理活性。ZHAO等<sup>[17]</sup>指出, Lut可通过抑制PTGS2/NF-κB信号通路减轻炎症反应, 从而缓解单纯疱疹性角膜炎; 此外, Lut可增强血-视网膜屏障保护功能, 维持视网膜微环境稳定性<sup>[18]</sup>。本研究经预实验对Lut浓度进行筛选, 结果显示: 2.5 g/L Lut组视网膜组织中Lut含量低于检测下限; 5、10、20 g/L Lut组眼表及视网膜组织无明显病理损伤, 且药物浓度与组织中Lut含量呈正相关; 25 g/L Lut组部分大鼠出现轻微结膜充血, 提示该浓度接近局部给药的毒性阈值。基于此, 本研究正式实验选取5、10、20 g/L作为低、中、高剂量梯度, 既涵盖有效药理浓度范围, 又规避毒性风险。实验结果显示, 低、中、高剂量Lut可提

高Treg细胞比例并促进小胶质细胞向M2型极化, 上调紧密连接蛋白表达, 表明Lut可调节免疫紊乱、减轻眼部炎症损伤、增强血-视网膜屏障保护功能。

Notch1/Jagged1/Hes1信号通路在决定细胞命运、免疫稳态调控及炎症反应中发挥关键作用。Notch1为Notch家族主要受体, 广泛表达于T细胞等免疫细胞及眼部组织细胞, 与Jagged1配体结合后激活通路, 通过靶向下游核心靶基因(*Hes1*), 抑制靶基因转录, 参与细胞分化及炎症调控<sup>[19]</sup>。文献指出, Notch1受体与配体Jagged1结合, 会激活下游Hes1。Hes1可直接结合Th17细胞分化关键因子的启动子区域, 进而促进CD4<sup>+</sup> T细胞向Th17细胞分化, 打破Th17/Treg平衡<sup>[20]</sup>; 此外, Notch1/Jagged1/Hes1通路与小胶质细胞的极化密切相关, 抑制该通路活性可促进小胶质细胞向M2型极化, 减轻组织炎性损伤<sup>[21]</sup>。QU等<sup>[7]</sup>指出, Notch1/Jagged1/Hes1信号通路在EAU大鼠眼部组织中相关蛋白活性升高, 加重视网膜线粒体损伤。抑制Notch信号通路可改善葡萄膜炎患

者T淋巴细胞Th17/Treg失衡并抑制细胞凋亡,进而缓解眼部炎症<sup>[22]</sup>。本研究结果同样显示:EAU大鼠视网膜组织Notch1/Jagged1/Hes1信号通路相关蛋白活性升高,炎症反应增强,低、中、高剂量Lut可显著降低Notch1/Jagged1/Hes1通路蛋白表达水平,减轻视网膜组织炎症损伤,表明Lut可通过抑制Notch1/Jagged1/Hes1通路的激活减轻EAU大鼠病理损伤。为验证该推测,本研究同时以高剂量Lut和JFC(Notch通路激活剂)干预大鼠,结果显示高剂量Lut对大鼠视网膜组织炎症情况的改善作用被逆转,JFC可部分抵消Lut对EAU的治疗效果。这说明Lut对EAU大鼠相关病理损伤的减轻作用可能是通过抑制Notch1/Jagged1/Hes1通路实现的。与人工合成的Notch通路抑制剂相比,Lut具有更好的生物相容性和较低的毒性。Notch通路与NF- $\kappa$ B通路在免疫调节和炎症反应中存在密切的交互作用,如Notch信号的激活可调节NF- $\kappa$ B通路的活性,影响免疫细胞的分化和功能<sup>[23]</sup>。同时,Lut可通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路减少炎症因子的释放水平<sup>[24]</sup>。因此,Lut可能通过同时抑制Notch和NF- $\kappa$ B通路发挥协同抗炎作用,从而高效缓解EAU的炎症反应。在未来联合用药中,可考虑将Lut与针对NF- $\kappa$ B通路的特异性抑制剂联合使用,以增强治疗效果。

综上所述,本研究首次揭示了Lut可能通过调控Notch1/Jagged1/Hes1通路调节Th17/Treg平衡和小胶质细胞极化,减轻EAU大鼠视网膜炎症反应,增强血-视网膜屏障保护功能。下一步将通过LPS诱导BV2小胶质细胞,进一步验证Lut调控Notch1/Jagged1/Hes1通路的作用机制。

### 参考文献 (References)

- [1] CAO F, LIANG K, TANG W W, et al. Polyvinylpyrrolidone-curcumin nanoparticles with immune regulatory and metabolism regulatory effects for the treatment of experimental autoimmune uveitis [J]. *J Control Release*, 2024, 372(1): 551-70.
- [2] ZHANG Y, QU X, XU N, et al. Mechanism of *Prunella vulgaris* L. and luteolin in restoring Tfh/Tfr balance and alleviating oxidative stress in Graves' disease [J]. *Phytomedicine*, 2024, 132: 155818.
- [3] DING T, YI T, LI Y, et al. Luteolin attenuates lupus nephritis by regulating macrophage oxidative stress via HIF-1 $\alpha$  pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 953: 175823.
- [4] 张淑荣, 张琦颖. 木犀草素通过TLR4/MyD88信号通路对大鼠烟曲霉菌性角膜炎的调控作用[J]. *吉林大学学报(医学版)* (ZHANG S R, ZHANG Q Y. Regulatory effect of luteolin on *Aspergillus fumigatus* keratitis through TLR4/MyD88 signaling pathway in rats [J]. *Journal of Jilin University, Medicine Edition*), 2021, 47(2): 315-22.
- [5] WANG K, CAO X M, YANG L, et al. Modulating Th1/Th2 drift in asthma-related immune inflammation by enhancing bone mesenchymal stem cell homing through targeted inhibition of the Notch1/Jagged1 signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 130(1): 1-13.
- [6] YIN X, QIU Y, LI Z, et al. Longdan Xiegan Decoction alleviates experimental autoimmune uveitis in rats by inhibiting Notch signaling pathway activation and Th17 cell differentiation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 136(1): 1-16.
- [7] QU R, PENG Y, XU S Q, et al. RBPJ knockdown promotes M2 macrophage polarization through mitochondrial ROS-mediated Notch1-Jagged1-Hes1 signaling pathway in uveitis [J]. *Inflammation*, 2025, 48(1): 133-50.
- [8] JIANG Z X, LIANG K, GAO X, et al. Fe-curcumin nanozyme-mediated immunosuppression and anti-inflammation in experimental autoimmune uveitis [J]. *Biomater Res*, 2023, 27(1): 131-45.
- [9] GHAVAMI A, ABTAHI FROUSHANI S M, TEHRANI A. Oral administration of piperine ameliorates experimental autoimmune uveitis [J]. *Inflammation*, 2025, 48(3): 1003-14.
- [10] 陈蓓, 连李斌. 丹皮酚抑制Notch1/Jagged1信号通路对妊娠糖尿病大鼠糖代谢紊乱的改善作用[J]. *河北医药(CHEN B, LIAN L B. Paeonol alleviates glucose metabolism disorder in gestational diabetes mellitus rats by inhibiting the Notch1/Jagged1 signaling pathway [J]. Hebei Medical Journal*), 2023, 45(11): 1632-36.
- [11] ZHOU M X, QU R Y, YIN X W, et al. Prednisone acetate modulates Th1/Th2 and Th17/Treg cell homeostasis in experimental autoimmune uveitis via orchestrating the Notch signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116: 109809.
- [12] PETERS K, MCDONALD T, MUHAMMAD F, et al. TIGIT stimulation suppresses autoimmune uveitis by inhibiting Th17 cell infiltration [J]. *J Leukoc Biol*, 2024, 116(5): 1054-60.
- [13] HUANG J X, WANG X T, LI N, et al. YY1 Lactylation aggravates autoimmune uveitis by enhancing microglial functions via inflammatory genes [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(19): 1-16.
- [14] SHU N, ZHANG Z, WANG X T, et al. Apigenin alleviates autoimmune uveitis by inhibiting microglia M1 pro-inflammatory polarization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2023, 64(5): 21-30.
- [15] HE S Y, LI W Q, WANG G Q, et al. FTO-mediated m6A modification alleviates autoimmune uveitis by regulating microglia phenotypes via the GPC4/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling axis [J]. *Genes Dis*, 2022, 10(5): 2179-93.
- [16] TANG L, ZHANG C Y, YANG Q, et al. Melatonin maintains inner blood-retinal barrier via inhibition of p38/TXNIP/NF- $\kappa$ B pathway in diabetic retinopathy [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(8): 5848-64.
- [17] ZHAO X D, REN Z C, CAO D W, et al. Luteolin alleviates Herpes Simplex Keratitis by inhibiting inflammatory responses via suppressing the PTGS2/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2025, 17(5): 3307-21.
- [18] REN Y, LIANG H, XIE M J, et al. Natural plant medications for the treatment of retinal diseases: the blood-retinal barrier as a clue [J]. *Phytomedicine*, 2024, 130: 155568.
- [19] 余文英, 修志标, 林泽豪, 等. 基于Notch1/Jagged1/Hes1信号通路探讨针刀调控巨噬细胞极化抑制兔膝关节骨关节炎滑膜炎

- 性反应的作用机制[J]. 针刺研究(YU W Y, XIU Z B, LIN Z H, et al. Effects of acupotomy therapy on macrophage polarization and inhibition of synovial inflammation in rabbits with knee osteoarthritis based on the Notch1/Jagged1/Hes1 signaling pathway [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(6): 649-57.
- [20] LIN Y W, ZHU X F, LI Y W, et al. LY294002 ameliorates psoriatic skin inflammation in mice via blocking the Notch1/Hes1-PTEN/AKT/IL-17A feedback loop [J]. *Clin Exp Immunol*, 2023, 213(1): 114-24.
- [21] 陈鑫, 王旭, 姜童子. 长春西汀抑制小胶质细胞M1/M2型极化改善慢性脑缺血大鼠认知功能及神经元损伤[J]. *解剖科学进展*(CHEN X, WANG X, JIANG T Z. Vinpocetine inhibits M1/M2 polarization of microglia and improves cognitive function and neuronal damage in rats with chronic cerebral ischemia [J]. *Progress of Anatomical Sciences*), 2022, 28(1): 46-50.
- [22] YIN X W, WEI H X, GUO L J, et al. Therapeutic effect of miR-30b-5p-loaded lentivirus on experimental autoimmune uveitis via inhibiting Notch signaling activation [J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 426-47.
- [23] FU Y Q, ZHENG Y, LI Z L, et al. SARM1 deletion inhibits astrogliosis and BBB damage through Jagged-1/Notch-1/NF- $\kappa$ B signaling to improve neurological function after ischemic stroke [J]. *Neurobiol Dis*, 2025, 208(7): 1-15.
- [24] ZHU M, SUN Y, SU Y, et al. Luteolin: a promising multifunctional natural flavonoid for human diseases [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(7): 3417-43.