

基于环氧化酶2和离子钙结合衔接分子1检测探讨金盏花对慢性不可预见性温应激小鼠神经保护作用

余婧孜*

(华北理工大学心理与精神卫生学院, 唐山 611230)

摘要: 目的 探讨金盏花提取物对慢性不可预见性温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)小鼠的神经保护作用。**方法** 将60只C57BL/6雄性小鼠随机分为空白对照组、模型组、金盏花低剂量组、金盏花中剂量组、金盏花高剂量组、阳性对照组, 每组10只。采用CUMS方法建立抑郁模型, 金盏花各剂量组分别给予50、100、200 mg/kg金盏花提取物灌胃, 阳性对照组给予20 mg/kg氟西汀灌胃, 连续干预21 d。检测各组小鼠糖水偏好率、旷场实验穿格次数, 采用免疫组织化学法检测海马组织环氧化酶2(cyclooxygenase-2, COX2)、离子钙结合衔接分子1(ionized calcium binding adaptor molecule 1, IBA1)表达。**结果** 模型组糖水偏好率、穿格次数低于空白对照组($P<0.05$), COX2、IBA1表达高于空白对照组($P<0.05$)。金盏花中、高剂量组糖水偏好率、穿格次数高于模型组($P<0.05$), COX2、IBA1表达低于模型组($P<0.05$)。**结论** 金盏花提取物能够改善CUMS小鼠抑郁样行为, 通过抑制神经炎症反应发挥神经保护作用。

关键词: 金盏花; 慢性不可预见性温和应激; 环氧化酶2; 离子钙结合衔接分子1; 神经保护

0 引言

抑郁症患病率在全球范围内持续攀升, 而现有一线抗抑郁药物起效周期长、停药复发率高, 这一现实推动着研究者不断寻找新的干预靶点。神经炎症假说近年受到广泛关注: 慢性应激状态下, 海马区小胶质细胞持续激活, 促炎因子大量释放, 神经元可塑性随之受损, 与抑郁样行为的形成高度吻合^[1]。离子钙结合衔接分子1(ionized calcium binding adaptor molecule 1, IBA1)是小胶质细胞的特异性标志蛋白, 其表达水平可直接反映小胶质细胞的激活程度; 环氧化酶2(cyclooxygenase-2, COX2)则是炎症级联反应中的关键催化酶, 二者的协同上调与神经炎症进展密切相关, 是评价神经保护干预效果的重要指标^[2]。金盏花(*Calendula officinalis* L.)含有三萜类、黄酮类等多种活性物质, 已有研究证实其具有抗炎和抗氧化活性, 但对中枢神经系统的保护作用尚缺乏系统性在体实验验证。基于此, 本研究以慢性不可预见性温和应激(chronic unpredictable mild stress,

CUMS)小鼠为模型, 通过检测海马组织COX2和IBA1的表达, 探讨金盏花提取物是否能够通过调控神经炎症反应发挥抗抑郁效应, 以期为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料与试剂

选取SPF级C57BL/6雄性小鼠60只, 鼠龄8周, 体重(20±2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号SCXK(京)2021-0006。小鼠饲养于温度(22±2) °C、湿度(55±5)%、12 h光照/12 h黑暗循环的环境中。小鼠自由饮水摄食, 适应性饲养7 d后开始实验。

COX2(货号 ab179800)、IBA1(货号 ab178846)(英国Abcam公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与造模

60只小鼠随机分为空白对照组、模型组、金盏花低

剂量组(50 mg/kg)、金盏花中剂量组(100 mg/kg)、金盏花高剂量组(200 mg/kg)、阳性对照组(氟西汀 20 mg/kg), 每组 10 只。空白对照组小鼠正常饲养, 不进行应激处理。其余各组小鼠接受 CUMS 造模, 造模方法参考文献方法并略作修改^[3]。应激程序包括禁食 24 h、禁水 24 h、潮湿垫料 24 h、45°笼具倾斜 24 h、昼夜颠倒 24 h、夹尾 5 min、束缚 2 h、冰水游泳 5 min 等 8 种应激源。每天随机选择 1~2 种应激方式, 连续应激 28 d, 相同应激方式不连续出现。造模期间每周测定小鼠体质量和糖水偏好率, 评估造模效果。

1.2.2 给药方法

造模成功后, 金盏花低、中、高剂量组分别给予 50、100、200 mg/kg 金盏花提取物灌胃, 阳性对照组给予 20 mg/kg 盐酸氟西汀灌胃, 空白对照组和模型组给予等量生理盐水灌胃。各组小鼠每日灌胃 1 次, 灌胃体积为 0.1 mL/10 g, 连续给药 21 d。给药期间继续对造模组小鼠进行应激处理。

1.2.3 行为学检测

末次给药 24 h 后进行行为学检测。糖水偏好实验: 小鼠单笼饲养, 同时提供 1%蔗糖水和纯水, 24 h 后记录两瓶液体消耗量^[4]。糖水偏好率=蔗糖水消耗量/(蔗糖水消耗量+纯水消耗量)×100%。旷场实验: 小鼠置于 50 cm×50 cm×40 cm 的旷场箱中央, 记录 5 min 内小鼠穿格次数。每只小鼠测试后用 75%乙醇清洁旷场箱。

1.2.4 标本采集与处理

行为学检测完成后, 小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉。小鼠麻醉后经心脏灌注 0.9%生理盐水 100 mL, 继续灌注 4%多聚甲醛 100 mL。灌注完成后断头取脑, 4%多聚甲醛固定 24 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。连续切片, 片厚 5 μm, 备用。

1.2.5 免疫组织化学检测

石蜡切片常规脱蜡至水, 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min 消除内源性过氧化物酶。枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)高压修复抗原 5 min。5%牛血清白蛋白室温封闭 30 min。滴加一抗 COX2(稀释比例 1:200, V:V)或 IBA1(稀释比例 1:500, V:V), 4 °C 过夜。滴加生物素标记的二抗, 室温孵育 30 min。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素, 室温孵育 30 min。二氨基联苯胺显色, 苏木素复染, 脱水透明封片。在显微镜下观察并拍照, 每张切片随机选取 5 个视野, 使用 Image J 软件分析阳性表达率。阳性表达率=阳性细胞数/总细胞数×100%。

1.3 观察指标

观察各组小鼠糖水偏好率、旷场实验穿格次数、海马组织 COX2 和 IBA1 阳性表达率。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 各组小鼠糖水偏好率和穿格次数比较

模型组小鼠糖水偏好率、穿格次数低于空白对照组($P < 0.05$)。金盏花中剂量组、高剂量组及阳性对照组糖水偏好率、穿格次数高于模型组($P < 0.05$)。金盏花高剂量组与阳性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠糖水偏好率和穿格次数比较

| 组别 | <i>n</i> | 糖水偏好率/% | 穿格次数/次 |
|------------|----------|--------------|----------------|
| 空白对照组 | 10 | 78.32±4.15 | 182.45±15.23 |
| 模型组 | 10 | 52.47±5.28* | 98.34±12.56* |
| 金盏花低剂量组 | 10 | 56.83±6.12* | 105.67±13.82* |
| 金盏花中剂量组 | 10 | 65.94±5.47*# | 138.52±14.35*# |
| 金盏花高剂量组 | 10 | 74.26±4.83# | 168.73±16.48# |
| 阳性对照组 | 10 | 75.58±5.06# | 174.26±15.87# |
| <i>F</i> 值 | - | 87.342 | 123.456 |
| <i>P</i> 值 | - | <0.001 | <0.001 |

注: *与空白对照组比较, $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, 下同。

2.2 各组小鼠海马组织 COX2 表达比较

模型组小鼠海马组织 COX2 阳性表达率高于空白对照组($P < 0.05$)。金盏花中剂量组、高剂量组及阳性对照组 COX2 阳性表达率低于模型组($P < 0.05$)。金盏花高剂量组与阳性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠海马组织 COX2 阳性表达率比较

| 组别 | <i>n</i> | COX2 阳性表达率/% |
|------------|----------|--------------|
| 空白对照组 | 10 | 12.34±2.15 |
| 模型组 | 10 | 45.67±4.28* |
| 金盏花低剂量组 | 10 | 42.15±4.56* |
| 金盏花中剂量组 | 10 | 32.48±3.82*# |
| 金盏花高剂量组 | 10 | 20.56±2.94# |
| 阳性对照组 | 10 | 18.73±2.67# |
| <i>F</i> 值 | - | 215.687 |
| <i>P</i> 值 | - | <0.001 |

2.3 各组小鼠海马组织 IBA1 表达比较

模型组小鼠海马组织 IBA1 阳性表达率高于空白对照组($P < 0.05$)。金盏花中剂量组、高剂量组及阳性对照组 IBA1 阳性表达率低于模型组($P < 0.05$)。金盏花高剂量组与阳性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠海马组织 IBA1 阳性表达率比较

| 组别 | n | IBA1 阳性表达率/% |
|---------|----|--------------|
| 空白对照组 | 10 | 8.45±1.67 |
| 模型组 | 10 | 38.92±3.85* |
| 金盏花低剂量组 | 10 | 36.27±4.12* |
| 金盏花中剂量组 | 10 | 26.53±3.24*# |
| 金盏花高剂量组 | 10 | 14.68±2.15# |
| 阳性对照组 | 10 | 12.94±1.98# |
| F 值 | - | 198.543 |
| P 值 | - | <0.001 |

3 讨论与结论

本研究通过建立 CUMS 小鼠模型探讨金盏花提取物的抗抑郁作用及其神经保护机制。结果显示模型组小鼠糖水偏好率和穿格次数显著降低,表现出典型的抑郁样行为。金盏花提取物干预后,中、高剂量组小鼠糖水偏好率和穿格次数显著升高,提示金盏花提取物能够改善 CUMS 诱导的抑郁样行为。该作用呈剂量依赖性,高剂量组效果与氟西汀相当。

海马属于情绪调节的关键脑区,慢性应激可导致海马神经元损伤和突触可塑性下降^[5]。神经炎症在慢性应激诱导的海马损伤中发挥重要作用。COX2 是炎症反应的关键酶,正常情况下该酶在中枢神经系统中表达水平较低。应激状态下 COX2 表达上调,催化花生四烯酸生成前列腺素 E₂等炎症介质,加重神经元损伤^[6]。本研究发现模型组小鼠海马组织 COX2 表达显著升高,金盏花高剂量组能够显著降低 COX2 表达。该结果提示金盏花提取物可能通过抑制 COX2 表达减轻神经炎症反应。

小胶质细胞是中枢神经系统的固有免疫细胞,该细胞在维持脑内环境稳态中发挥重要作用^[7]。生理状态下小胶质细胞处于静息状态,监测脑内微环境变化。慢性应激可激活小胶质细胞,激活的小胶质细胞释放促炎因子、活性氧等,参与神经炎症反应。IBA1 是小胶质细胞的特异性标志物,该蛋白参与细胞骨架重组和细胞运动^[8]。IBA1 表达水平升高反映小胶质细胞激活。本研究显示模型组小鼠海马组织 IBA1 表达显著升高,小胶质细胞呈激活状态。金盏花高剂量组能够显著降低 IBA1 表达,抑制小胶质细胞活化。该结果表明金盏花提取物可能通过抑制小胶质细胞活化发挥神经保护作用。

金盏花提取物含有多种生物活性成分,三萜类化合物属于金盏花的主要活性成分。三萜类化合物具有抗炎作用,该类化合物能够抑制核因子- κ B 信号通路激活,减少促炎因子生成^[9]。黄酮类化合物具有抗氧化作用,该类化合物能够清除自由基,减轻氧化应激损伤^[10]。金盏花提取物可能通过多成分、多靶点的方式发挥抗抑郁和神经保护作用。金盏花提取物抑制 COX2 表达和小胶质细胞活化可能是其发挥神经保护作用的重要机制。

本研究存在一定局限性。研究仅检测了海马组织的炎症指标,其他脑区如前额叶皮质的变化尚不明确;研究未检测炎症因子如白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 等的表达水平;金盏花提取物抑制神经炎症的具体分子机制需要进一步探讨;研究未对金盏花提取物的有效成分进行分离鉴定,有效成分的作用机制有待深入研究。

本研究表明金盏花提取物能够改善 CUMS 小鼠的抑郁样行为,降低海马组织 COX2 和 IBA1 表达,抑制神经炎症反应。该研究为金盏花治疗抑郁症提供了实验依据,为开发新型抗抑郁药物提供了思路。

参考文献

- [1] 杜鑫,张晓彤,芦娟,等.豆腐果苷通过 NCALD/sGC/cGMP/PKG 轴缓解慢性不可预见性温和应激大鼠的抑郁样行为[J].南方医科大学学报,2025,45(12):2699-2707.
- [2] 梁晓涛,梁小珊,熊一凡,等.加味柴胡桂枝汤通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路改善慢性不可预见性温和应激模型小鼠的焦虑和抑郁状态[J].南方医科大学学报,2025,45(10):2146-2159.
- [3] 王璐君,刘玉晨,费维成.金盏花提取液对皮肤损伤的舒缓作用[J].中国化妆品,2025(2):88-95.
- [4] 张冬颀,李龙飞,张露文,等.橙皮油素改善慢性应激小鼠焦虑抑郁样行为的作用及机制研究[J].沈阳药科大学学报,2025,42(3):262-273.
- [5] 宋莹莹,韩欣妍,王梦雪,等.人参皂苷 Rb1 改善实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠神经炎症的作用及机制[J].中药药理与临床,2024,40(12):55-60.
- [6] 郑文旭.中药巴戟天的有效成分 β -谷甾醇通过调控 p53 通路对帕金森病小鼠的神经保护作用及机制研究[D].沈阳:中国医科大学,2024.
- [7] 代茂莎. Maresin1 通过 P38 MAPK 通路减少脓毒症诱发的脑小胶质细胞活化的机制研究[D].武汉:华中科技大学,2024.
- [8] 陈赞,杜坤锐,王婧吉,等.电针对慢性不可预见性温和应激致抑郁小鼠海马氧化应激-calpain-炎症信号轴的影响[J].安徽中医药大学学报,2023,42(5):44-50.
- [9] 苏世杰,林东新,刘壮壮,等.基于 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路探讨泽泻汤改善高脂饮食诱导小鼠认知障碍的作用机制[J].中华中医药杂志,2023,38(9):4154-4160.
- [10] 焦海燕.抑郁证肝郁脾虚证小鼠 PEBP1-GPX4 介导的铁死亡相关机制及逍遥散的调节作用[D].北京:北京中医药大学,2022.