·实验研究·

基于海马 DG 区小胶质细胞 P2X7/NLRP3 信号研究 DD 海马 CA3 神经突触可塑性机制

王婷婷[2,4],邹蔓姝[2,3],郭海鹏[2],余晓诗[2],张　瑶[2],向紫萱[2],苏海龙[2],王宇红[2,3],韩远山[1,3*]
(1 湖南中医药大学第一附属医院,长沙 410000; 2 湖南中医药大学科技创新中心,长沙 410208; 3 抑郁类疾病中医药防治湖南省重点实验室,长沙 410208; 4 郫都区红光街道社区卫生服务中心,成都 611730)

[摘要] **目的**:探讨嘌呤能受体 P2X 配体门控离子通道 7(P2X purinoceptor 7,P2X7)-核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NOD like receptor family pyrin domain containing 3,NLRP3)通路在糖尿病并发抑郁症(diabetes mellitus with depression,DD)中的作用机制。**方法**:将 60 只 SD 大鼠随机分为对照组(Con)、糖尿病组(DM)、抑郁组(Dep)、糖尿病并发抑郁组(DD)、阳性药[二甲双胍(0.18 g·kg^{-1})联合氟西汀(1.8 mg·kg^{-1})]组(Y)、P2X7 抑制剂(BBG,30 mg·kg^{-1})组,每组 10 只。通过 4 周高脂饲料饲养联合链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)腹腔注射及 4 周慢性温和不可预知应激(chronic unpredictable mild stress,CUMS)联合孤笼饲养建立 DD 大鼠模型。抑制剂组大鼠于造模 d 15,每天进行腹腔注射,连续 14 d。在造模和药物干预完成后,采用旷场实验、强迫游泳实验和 Morris 水迷宫检测大鼠抑郁样行为和记忆认知功能;酶联免疫吸附测定检测血清中去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)、5-羟色胺(5-hydroxyteyptamine,5-HT)、多巴胺(dopamine,DA)含量;免疫荧光检测海马 P2X7/Iba-1、NLRP3/Iba-1、突触后致密蛋白-95(postsynaptic density protein-95,PSD95)、突触蛋白-1(synapsin1,SYN1);苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色和尼氏染色检测海马神经元损伤情况;免疫印迹法(Western blot)检测 P2X7-NLRP3 轴相关蛋白 P2X7、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白、胱天蛋白酶-1(caspase-1)、白介素-1β 和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)的表达情况。**结果**:BBG 和阳性药可有效改善 DD 大鼠的体质量和空腹血糖。行为学结果表明,BBG 和阳性药可减少强迫游泳不动时间,增加旷场实验活动总距离和活动总次数,缩短成功潜伏期时间,增加平台所在象限停留时间。病理结果显示,BBG 和阳性药可改善 DD 大鼠海马脑区神经元的病理损伤。生化结果表明,BBG 和阳性药可上调 DD 大鼠血清中 5-HT、DA、NE 水平。免疫荧光和 Western blot 结果表明,BBG 可降低海马中 P2X7、NLRP3 等的表达,增加 PSD-95、SYN1、BDNF 的表达。**结论**:BBG 可通过抑制 P2X7/NLRP3 轴和海马小胶质细胞激活,进一步改善神经炎症与 NLRP3 炎性小体的异常激活,从而提高海马中突触相关蛋白 PSD95、SYN 和 BDNF 的表达来发挥神经保护作用。

[关键词] P2X 配体门控离子通道 7/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 信号通路;糖尿病并发抑郁症;突触可塑性;成体海马神经发生

[中图分类号] R965　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003－3734(2026)11－1200－13

[基金项目] 湖南省科校联合基金资助项目(2025JJ90061);教育厅优青项目(24B0342;23B0360);长沙市自然科学基金资助项目(kq2502215);湖南省卫健委一般项目(w20243097);中药粉体与创新药物研究省部共建国家重点实验室培育基地开放基金资助项目(24PTKF1013)

[作者简介] 王婷婷,女,硕士研究生,主要从事神经药理研究。E-mail: 2537691234@qq.com。

[通讯作者] *韩远山,男,助理研究员,研究方向:中医药防治脑病。E-mail:1217983755@qq.com。

[DOI]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.11.011

Research on the mechanism of hippocampal CA3 synaptic plasticity in diabetes mellitus with depression based on P2X7/NLRP3 signaling in microglia of the DG region

WANG Ting-ting[2,4], ZOU Man-shu[2,3], GUO Hai-peng[2], YU Xiao-shi[2], ZHANG Yao[2], XIANG Zi-xuan[2], SU Hai-long[2], WANG Yu-hong[2,3], HAN Yuan-shan[1,3*]

(1 *The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410000, *China*; 2 *Technology Innovation Center*, *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208, *China*; 3 *Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prevention & Treatment of Depressive Disease*, *Changsha* 410208, *China*; 4 *Community Health Service Center of Hongguang Street*, *Pidu District*, *Chengdu* 611730, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the mechanism of the P2X purinoceptor 7 (P2X7)-NOD like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) pathway in diabetes mellitus with depression (DD). **Methods**: Sixty Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into six groups (n = 10 per group): control (Con), diabetes mellitus (DM), depression (Dep), diabetes mellitus with depression (DD), positive drug [metformin (0.18 g·kg^{-1}) + fluoxetine (1.8 mg·kg^{-1})] (Y), and P2X7 inhibitor [Brilliant Blue G (BBG), 30 mg·kg^{-1}]. DD rat models were established using 4 weeks of high-fat diet feeding combined with intraperitoneal streptozotocin (STZ) injection, followed by 4 weeks of chronic unpredictable mild stress (CUMS) combined with single caging. Rats in the inhibitor group received daily intraperitoneal injections starting from day 15 of modeling for 14 consecutive days. After modeling and drug intervention, behavioral tests (open field test, forced swim test, Morris water maze) were used to assess depression-like behaviors and cognitive function. Serum levels of norepinephrine (NE), 5-hydroxytryptamine (5-HT), and dopamine (DA) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunofluorescence was performed to detect hippocampal P2X7/Iba-1, NLRP3/Iba-1, postsynaptic density protein-95 (PSD95), and synapsin-1 (SYN1). Hippocampal neuronal damage was assessed using hematoxylin-eosin (HE) and Nissl staining. Western blotting was used to measure the expression of P2X7-NLRP3 axis-related proteins (P2X7, NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), caspase-1, interleukin-1β (IL-1β) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Results**: Both BBG and the positive drug effectively attenuated the loss of body weight and elevated fasting blood glucose in DD rats. Behavioral results showed that BBG and the positive drug reduced immobility time in the forced swim test, increased total distance traveled and total activity in the open field test, shortened escape latency, and increased the time spent in the target quadrant in the Morris water maze. Pathological results demonstrated that BBG and the positive drug ameliorated neuronal damage in the hippocampal region of DD rats. Biochemical analysis results indicated that BBG and the positive drug upregulated serum levels of 5-HT, DA, and NE. Immunofluorescence and Western blot results showed that BBG could reduce the expression of P2X7 and NLRP3 in the hippocampus, while increasing the expression of PSD-95, SYN-1, and BDNF. **Conclusion**: BBG exerts neuroprotective effects by inhibiting the P2X7/NLRP3 axis and hippocampal microglial activation, thereby ameliorating neuroinflammation and abnormal NLRP3 inflammasome activation. This leads to increased expression of synaptic-related proteins (PSD95, SYN) and BDNF in the hippocampus.

[**Key words**] P2X purinoceptor 7/NOD like receptor family pyrin domain containing 3 pathway; diabetes with depression; synaptic plasticity; adult hippocampal neurogenesis

糖尿病和抑郁症是全球性的健康问题,患病率不断上升,分别影响世界人口的 10.5% 和 5%[1-2]。抑郁症患者的特征为对日常活动失去兴趣、疲劳、情绪低落和认知障碍,损害日常功能[3]。糖尿病是一种多因素的代谢疾病,其特征是由于胰岛素缺乏或胰岛素抵抗引起的高血糖[4]。糖尿病和抑郁症都是常见的慢性疾病,它们会降低患者的功能、生活质量和预期寿命。这些疾病的共同发病已被广泛研

究,但尽管提出了几种假设都可能相互影响的潜在原因仍未得到充分阐明。这种合并症可归因于多种因素,包括管理慢性疾病的心理影响,潜在的共同遗传易感性和常见的病理生理异常,如下丘脑-垂体-肾上腺轴的失调和炎症状态[5-6]。

核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NOD like receptor family pyrin domain containing 3,NLRP3)是脑中最常研究的炎性小体,广泛存在于小胶质细胞[7]、少突胶质细胞[8]和星形胶质细胞[9]中。NLRP3 作为一种细胞内传感器,识别病原体相关分子模式和损伤相关分子模式,导致 NLRP3 炎性体的组装和激活。激活后,NLRP3 炎性体触发多种促炎细胞因子的产生,并在脑内创造炎症微环境,导致神经元变性[10]。药理学抑制 NLRP3 炎性体活化已被证明在多种啮齿动物炎性疾病模型中具有有效的疗效[11]。提示 NLRP3 炎性小体是神经炎症的首要执行者,可能是糖尿病并发抑郁症(diabetes mellitus with depression,DD)潜在的治疗靶点。嘌呤能受体 P2X 配体门控离子通道 7(P2X purinoceptor 7,P2X7),通过募集 NLRP3 炎性小体胱天蛋白酶-1(caspase-1)复合物在白介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)和 IL-18 的成熟中发挥关键作用[12-13]。DD 严重程度与促炎级联反应之间的正相关性表明,P2X7/NLRP3 信号通路可能是 DD 的可靠治疗靶点。

材料与方法

1 动物

实验选用 60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量范围为 180 ~ 200 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证:SCXK(湘)2021-0002,实验动物使用合格证号:SCXK(湘)2019-0009。饲养温度(25 ± 2) ℃,相对湿度(50 ± 5)%,12 h 明暗交替。本研究获得湖南中医药大学动物伦理委员会批准(审批号:LLBH-202303150007)。

2 药物

P2X7 抑制剂(BBG)购于 MCE 公司,货号:HY-50697。根据体表面积法换算大鼠的给药剂量为 30 mg·kg^{-1},配制方法为:将 BBG 依次加入 10% DMSO、40% PEG300、5% Tween-80、45% saline,混匀,配制成 3 mg·mL^{-1}的溶液待腹腔注射。盐酸氟西汀胶囊(法国 Patheon France 公司,国药准字 J20130010),二甲双胍片(石家庄以岭药业股份有限公司,国药准号 H20054790)均购自湖南中医药大学第一附属医院,取盐酸二甲双胍片和盐酸氟西汀胶囊内容物适量,加蒸馏水充分溶解,制成含二甲双胍 0.018 g·mL^{-1}、氟西汀 0.18 mg·mL^{-1}溶液。精密称取 1.0 g 戊巴比妥钠粉末,溶于 100 mL 生理盐水中得到 1% 的戊巴比妥钠溶液。

3 试剂

链脲佐菌素(streptozotocin,STZ,北京索莱宝科技有限公司,批号:506J022);PEG300(MCE 公司,货号:HY-Y0873);去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)、5-羟色胺(5-hydroxyteyptamine,5-HT)、多巴胺(dopamine,DA)酶联免疫试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,货号分别为 E-EL-0047、E-EL-0046、E-EL-0033);山羊抗兔二抗(美国 Proteintech 公司,货号:SA00003-2);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)山羊抗兔二抗(美国 Immunoway 公司,货号:RS0011);P2X7 抗体、NLRP3 抗体(Abcam 公司,货号:Ab307718、Ab4207),凋亡相关斑点样蛋白质(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD,ASC)抗体(武汉爱博泰克公司,货号:A1170),caspase-1 抗体(美国 Proteintech 公司,货号:22915-1-AP),突触素(synapsin,SYN)和突触后密度蛋白 95(postsynaptic density protein-95,PSD-95)抗体(美国 Affinity 公司,货号分别为 6531286、7844913);离子钙结合适配分子 1(ionized calcium-binding adapter molecule 1,Iba1)抗体(艾方生物科技有限公司,货号:AF301643)。

4 仪器

动物行为学分析系统(北京众实迪创科技发展有限责任公司,型号:LabMaze);全波长多功能酶标仪(美国 Perkinelmer 公司,型号:Enspire);台式低速冷冻离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司,型号:L530R);透射电镜(日本 Hitachi 公司,型号:HT7700);智能组织切片成像系统(美国 Perkinelmer 公司,型号:Vectra);超高分辨率激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司,型号:LSM800);蛋白印记系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:MPTC)。

5 糖尿病并发抑郁症大鼠模型构建

参照课题组前期方法[14-15]。SPF 级雄性 SD 大鼠在适应性饲养 5 d 后,随机分为正常饲养组(20 只)和高脂饲养组(40 只)。正常饲养组大鼠给予普通饲料,而高脂饲养组大鼠则喂食高脂饲料(67% 基础饲料 + 10% 猪油 + 20% 蔗糖 + 2.5% 胆固醇 + 0.5% 胆酸钠,high-fat diet,HFD),持续 4 周,期间正

常供水。高脂饲料喂养结束后,通过单次腹腔注射STZ(60 mg·kg^{-1})建立糖尿病大鼠模型。注射前,动物需禁食不禁水 12 h,且 STZ 需现配现用。注射后继续禁食 4 h,随后恢复正常饲料喂养。3 d 后,采集禁食 8 h 的大鼠尾静脉血,检测其空腹血糖值。实验筛选血糖值≥16.0 mmol·L^{-1}的动物视为建模成功的糖尿病模型大鼠。

随后,对已成模的糖尿病大鼠进行慢性温和不可预知应激(chronic unpredictable mild stress,CUMS)刺激复制抑郁症模型,实验中采用的应激方式包括噪声(8 h)、夹尾(1 min)、倾笼(45°倾斜,24 h)、电击(1 min)、昼夜颠倒(24 h)、潮湿垫料(12 h)、冰水浴(5 min)和禁食(8 h)等 8 种。应激期间,所有动物均单笼饲养,每天随机选取 1 ~ 2 种刺激方式,且相邻 2 d 的刺激方式不重复。整个应激过程持续 28 d,造模结束后,检测大鼠旷场实验活距离路程、水迷宫逃避潜伏期和强迫游泳不动时间判断模型是否构建成功,以建立糖尿病并发抑郁症大鼠模型[16]。

6 实验分组及给药

将已建成的糖尿病模型的大鼠按照体质量和空腹血糖值随机分为 4 组,分别为糖尿病组、糖尿病并发抑郁组、阳性药组(二甲双胍 + 氟西汀)、BBG 抑制剂组,每组 10 只。将正常饲养大鼠(20 只)设为正常组和单纯抑郁组,每组 10 只。除对照组和糖尿病组外,其余组大鼠孤笼饲养 4 周联合 CUMS 复制抑郁症模型。其中,阳性药组大鼠灌胃给予 0.18 g·kg^{-1}二甲双胍和 1.8 mg·kg^{-1}氟西汀,BBG 组于造模 d 15 开始腹腔注射(30 mg·kg^{-1}),*qd*,其余各组注射等体积生理盐水(5 mL·kg^{-1}),连续 2 周。正常组和模型组大鼠灌胃给予等体积的蒸馏水。以上所有组别均连续灌胃给药 28 d,*qd*,灌胃开始时间与慢性温和不可预知应激造模同步开始。

7 体质量和空腹血糖检测

体质量检测:从 d 35 开始监测体质量,每周同一时间点进行测量。体质量变化(%) = (d 63 的体质量 – d 35 的体质量)/d 35 的体质量。

空腹血糖检测:检测从 d 35 开始,每周固定时间点进行测量。大鼠禁食 8 h 后,使用采血针轻刺尾尖取血,弃去第一滴血液后,用血糖仪检测 2 次,取平均值作为最终结果。结束后用 75% 酒精给大鼠尾尖消毒。

8 行为学检测[17]

8.1 旷场实验 将大鼠放入 40 cm × 80 cm × 80 cm 的黑色敞箱中央,底部划为 25 个正方形小格,先自由活动 30 s,记录其接下来 5 min 内大鼠总活动距离和总活动次数,下一只测试前用乙醇擦拭箱体并晾干,防止上一只留下排泄物和气味干扰实验。

8.2 强迫游泳实验 将大鼠放入高 50 cm,直径 20 cm,水深约 40 cm 的透明圆柱储水筒中,先适应 1 min,记录其接下来 4 min 内大鼠的不动时间(大鼠两前爪停止游动,身体呈漂浮状态记为不动),且圆筒之间用黑色板子隔开,避免相互干扰。

8.3 Morris 水迷宫 水迷宫为 1 个椭圆形水池,分成 4 个象限。适应性训练期间,大鼠连续 4 d 从不同象限被放入水池中,以训练其找到水下平台,其中平台的位置保持不变。d 5 时进行定位巡航实验,将动物从第 1 象限放入水中,记录 60 s 内找到平台的时间。d 6 时进行空间探索实验,撤去水下平台,将动物从第 1 象限放入水中,记录 60 s 内大鼠在原平台所在象限中的停留游泳时间。

9 样本收集与处理

在行为学实验结束后,大鼠 *ip* 1% 戊巴比妥钠麻醉,注射剂量为 50 mg·kg^{-1},进行主动脉采血。采血完成后,一部分经心脏灌注生理盐水和多聚甲醛后,分离脑组织于 4% 多聚甲醛溶液中保存,用于病理及免疫荧光检测。一部分直接在冰上分离海马组织,于液氮中速冻,转移至 – 80 ℃超低温冰箱保存,用于酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)、Western blot 检测。血样经 4 ℃、3 000 r·min^{-1}离心 15 min 后,取上清于 – 80 ℃保存。

10 海马组织病理学观察

10.1 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色 将大鼠脑组织从 4% 多聚甲醛中取出;经常规石蜡包埋、冠状切片(5 μm)后,将切片脱蜡,依次水化,常规 HE 染色;脱水封片后观察海马 CA3 区的组织学变化。

10.2 尼氏染色 石蜡切片脱蜡后,置于尼氏染液中染色,蒸馏水洗去染液后,脱水、透明、封片,观察海马 CA3 区病理变化。

11 ELISA 检测

从 – 80 ℃取出分装好的血清,5 000 g 离心 10 min 取中层澄清液体,再次 5 000 g 离心 10 min 取中下层澄清血清待测。根据 ELISA 试剂盒,严格参照说明书上的步骤,检测血清中 5-HT、DA 和 NE 含量。

12 透射电镜

行为学结束后,麻醉大鼠,经心灌注,灌注结束后

立即断头取脑,迅速取出双侧海马组织,置于 2.5% 戊二醛中,用于电镜标本制作;将组织切块在 2.5% 戊二醛中固定 3 h 后。0.1 mol·L^{-1}磷酸缓冲液漂洗 3 次,1% 四氧化锇(锇酸)固定 1 h,0.1 mol·L^{-1}磷酸缓冲液漂洗 3 次,丙酮逐级脱水,Epen812 环氧树脂包埋剂与 100% 丙酮 1∶1比例浸泡 2 ~4 h,Epen812 环氧树脂包埋剂浸泡、包埋,LKB11800 型修块机修块、定位,LKB8800 型超薄切片机切片,经醋酸铀、硝酸铅双重染色,H-7500 型透射电镜观察并摄片。

13 免疫荧光实验

首先将石蜡切片依次置入二甲苯中 2 次,每次 15 min,然后用无水乙醇(100%、95%、85%、75%)梯度脱水,每梯度 5 min。接着用柠檬酸抗原修复液高温高压修复 3 min,冷却后用 PBS 清洗(3 次,每次 5 min)。组画笔标记后再在切片上滴加 3% H_2O_2,室温避光孵育 25 min,结束后用 PBS 清洗。甩干水分后滴加 10% 山羊血清封闭 30 min,接着甩干后滴加适当稀释比例的一抗,置于加水的湿盒内 4 ℃孵育过夜。清洗后向组织上滴加适宜浓度的二抗,室温孵育 30 min。清洗后向组织上滴加 50 ~100 μL TSA-FITC 染色工作液,室温避光孵育 10 min。清洗后再将玻片置于 1 ×柠檬酸中微波炉高火修复。再次封闭后重复孵育第 2 种一抗与二抗,步骤同前。清洗后再向组织上滴加 50 ~100 μL TSA-CY3 染色工作液室温避光孵育 10 min。清洗甩干后滴加含 DAPI 的封固剂,避光晾干后镜检。

将包埋石蜡块切片脱蜡,进行抗原修复,封闭,滴加抗体[PSD95(1∶200),SYN1(1∶200)],于 4 ℃孵育过夜。相应种属二抗(1∶100)避光孵育 2 h,DAPI 染核,滴加抗荧光淬灭剂后封片,扫描切片,ImageJ 软件分析 PSD-95,SYN1 的荧光强度。

14 Western blot 检测

取出冻存的海马组织,加入 RIPA 裂解液(加入 1% 蛋白酶抑制剂 PMSF)中,在冷冻研磨仪中充分研磨,研磨结束后于冷冻离心机 12 000 r·min^{-1}离心 15 min,取上清蛋白原液待测,根据 BCA 试剂盒说明书检测各组大鼠海马蛋白原液的蛋白浓度,根据蛋白原液,配制蛋白含量为 3 μg·μL^{-1}的蛋白上样液备用。根据蛋白不同分子量选用相应浓度的胶,进行加样、电泳、转膜、封闭、敷一抗 P2X7(1∶1 000)、NLRP3(1∶1 000)、ASC(1∶500)、Caspase-1(1∶20 000)、BDNF(1∶1 000)、β-actin(1∶20 000),于 4 ℃过夜,d 2 用 TBST 洗膜 3 次 ×5 min,加入一抗相应种属二抗(1∶15 000),37 ℃孵育 1 h,TBST 洗膜,配制显影液(A 液∶B 液 =1∶1),进行化学发光,用 ImageJ 软件分析条带灰度值。

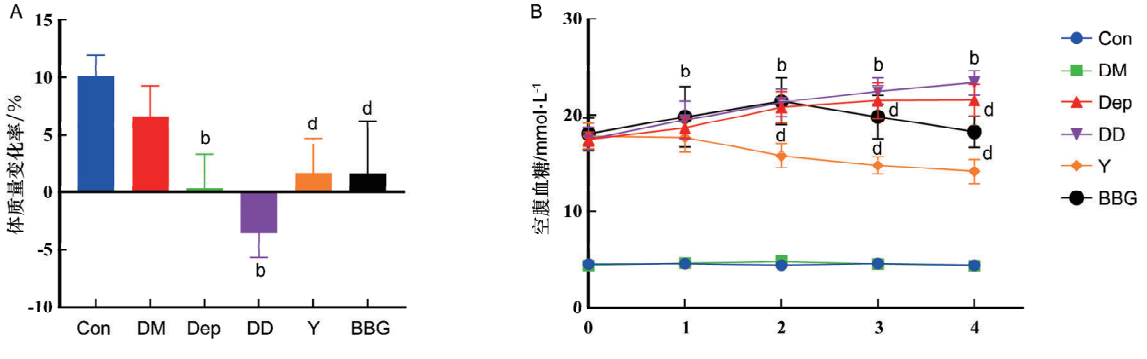
15 统计学分析

使用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(One way ANOVA),两两比较方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。

结　果

1 对 DD 大鼠体质量、空腹血糖的影响

与 Con 组比较,DD 组大鼠体质量显著降低($P<0.01$),与 DD 组比较,阳性药组、BBG 抑制剂组大鼠体质量显著增高($P<0.01$);与 Con 组比较,DM 组、Dep 组和 DD 组大鼠空腹血糖显著升高($P<0.01$);与 DD 组比较,阳性药组、BBG 组大鼠血糖显著降低($P<0.01$),见图 1。

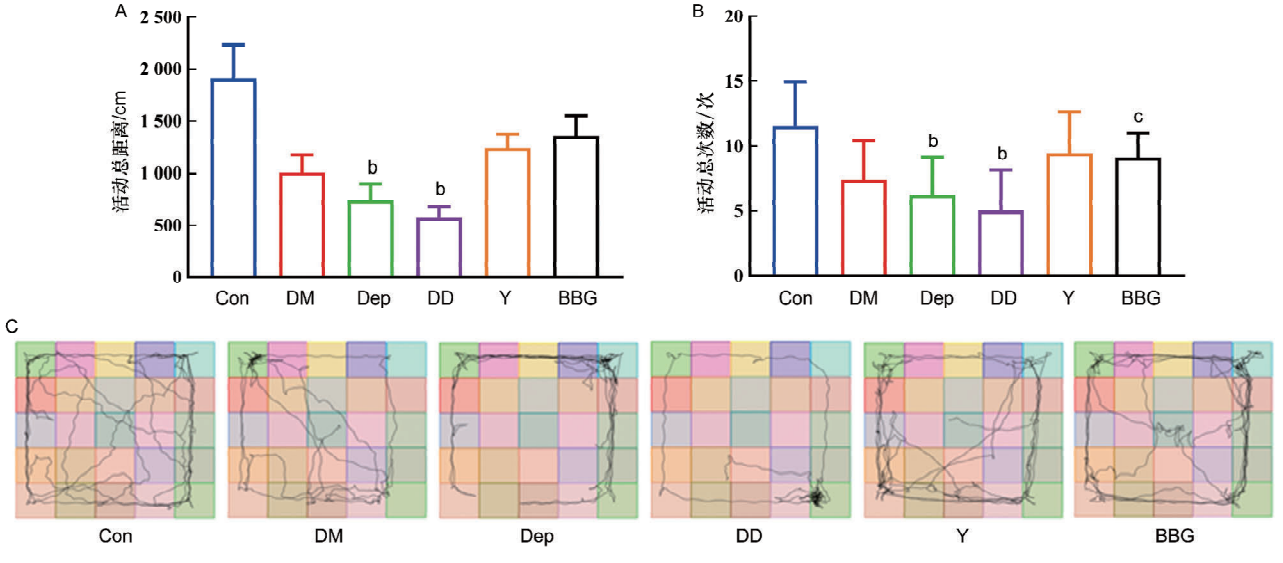


Con:对照组,Dep:抑郁症组,DM:糖尿病组,DD:糖尿病并发抑郁症组,Y:阳性药组,BBG:P2X7 受体抑制剂组,图 1 ~10 同;与 Con 组相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;与 DD 组相比,c:$P<0.05$,d:$P<0.01$

图 1 各组大鼠体质量和空腹血糖变化情况($n=10$)

2　对 DD 大鼠的抑郁样行为的影响

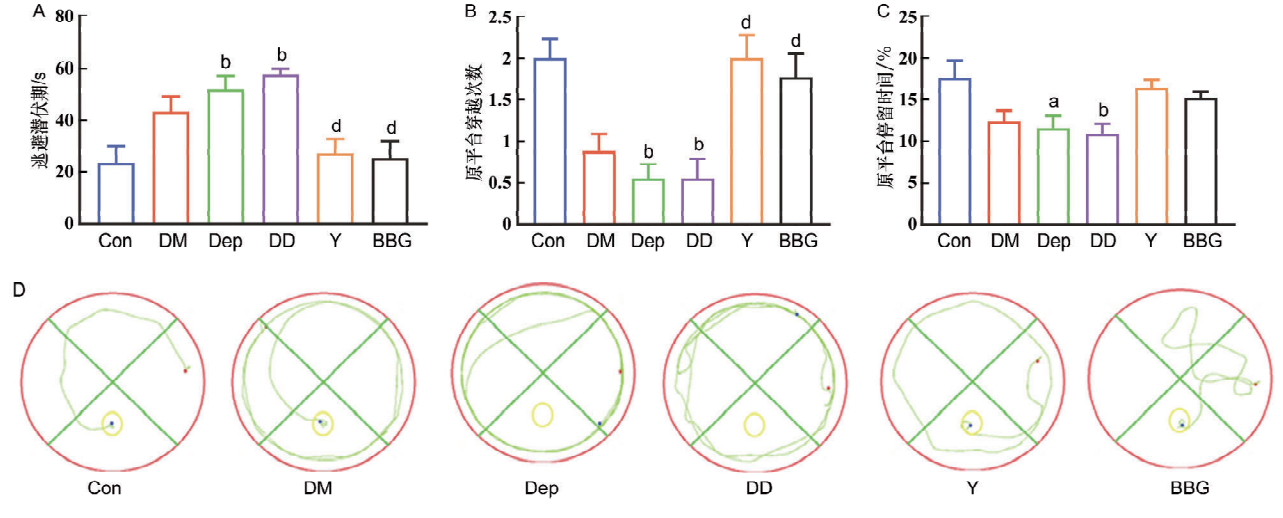
2.1　旷场实验结果　与 Con 组相比，Dep 组、DD 组在旷场中的活动总距离和活动总次数显著减少（$P<0.01$）；与 DD 组相比，阳性药组和 BBG 抑制剂组大鼠活动总距离虽有增加，但无显著性差异，活动总次数显著增加（$P<0.05$），见图 2。



A：旷场活动总次数；B：旷场活动总距离；C：旷场代表性轨迹图；与 Con 组相比，a：$P<0.05$，b：$P<0.01$；与 DD 组相比，c：$P<0.05$，d：$P<0.01$

图 2　各组大鼠抑郁样行为情况比较（$n=10$）

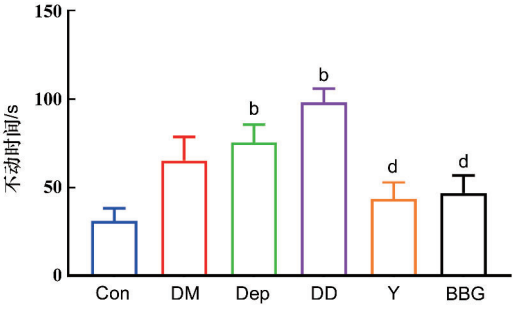
2.2　水迷宫实验结果　本实验通过比较大鼠找到水下平台的时间来评估动物的学习功能。结果发现，与 Con 组相比，Dep 组、DD 组逃避潜伏期明显延长（$P<0.01$），60 s 内穿越原平台次数减少（$P<0.01$），原平台停留时间比降低（$P<0.05$，$P<0.01$），而 DM 组逃避潜伏期时间明显增加，原平台穿越次数和原平台停留时间减少但无显著性差异；与 DD 组相比，阳性药组和 BBG 抑制剂组大鼠的逃避潜伏期明显缩短（$P<0.01$），60 s 内穿越原平台次数增多（$P<0.01$），原平台停留时间比增加但无显著性差异（见图 3）。



A：定位航行逃避潜伏期；B：空间探索原平台穿越次数；C：空间探索原平台象限停留时间%；D：定位航行代表性轨迹图；与 Con 组相比，a：$P<0.05$，b：$P<0.01$；与 DD 组相比，c：$P<0.05$，d：$P<0.01$

图 3　各组大鼠认知障碍情况（$n=10$）

2.3　强迫游泳实验结果　与 Con 组相比，Dep 组、DD 组大鼠在强迫游泳实验中的不动时间显著延长（$P<0.01$），Dep 组不动时间增加但无显著性差异；与 DD 组相比，阳性药组和 BBG 抑制剂组的不动时间明显缩短（$P<0.01$），见图 4。

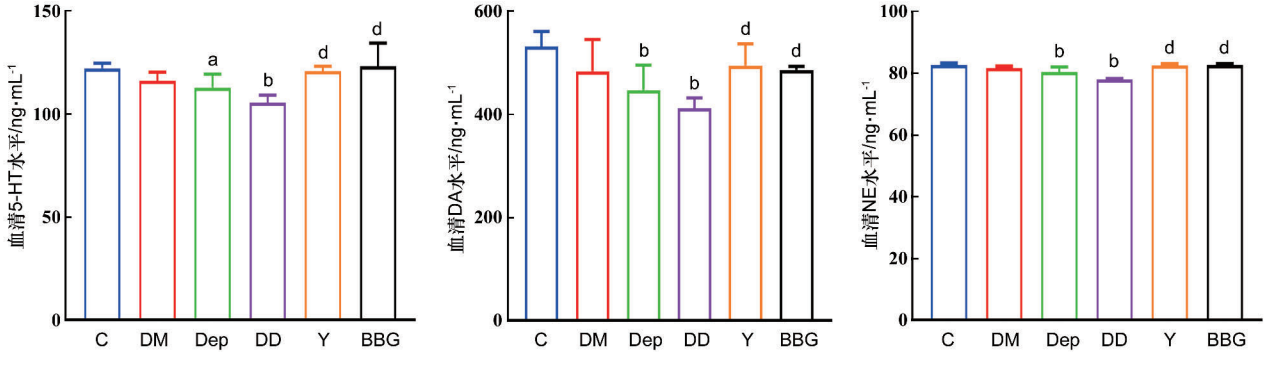


与 Con 组相比，a：$P<0.05$，b：$P<0.01$；与 DD 组相比，c：$P<0.05$，d：$P<0.01$

图 4　各组大鼠强迫游泳不动时间情况比较（$n=10$）

3　对 DD 大鼠血清 5-HT、NE、DA 的影响

与 Con 组相比，DM 组、Dep 组和 DD 组大鼠血清中 5-HT、DA 和 NE 水平显著降低（$P<0.01$ 或 $P<0.05$）。与 DD 组相比，阳性药组、BBG 组大鼠血清中 5-HT、DA 和 NE 的水平显著升高（$P<0.01$），见图 5。



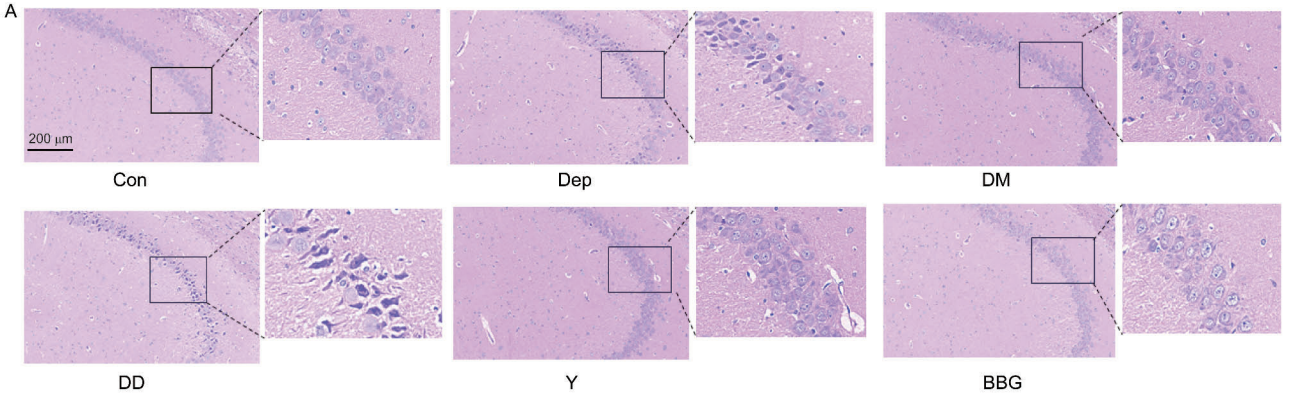
与 Con 组相比，a：$P<0.05$，b：$P<0.01$；与 DD 组相比，c：$P<0.05$，d：$P<0.01$

图 5　各组大鼠血清中 5-HT、DA、NE 水平比较（$n=10$）

4　改善 DD 大鼠海马病理损伤

HE 染色结果显示，对照组大鼠海马神经元形态完整；与 Con 组比较，DM 组、Dep 组和 DD 组大鼠海马神经元核固缩较严重，退化核坏死细胞增多；与 DD 组相比，阳性药组、BBG 组大鼠神经元形态改善、完整神经元增多。

尼氏染色结果显示，对照组大鼠海马神经元结构清晰，尼氏体完整；与 Con 组相比，DM 组、Dep 组和 DD 组大鼠海马神经元皱缩、胞体缩小，尼氏体崩解丢失；与 DD 组相比，阳性药组、BBG 组大鼠神经元破碎和尼氏体丢失情况不同程度完善（见图 6）。



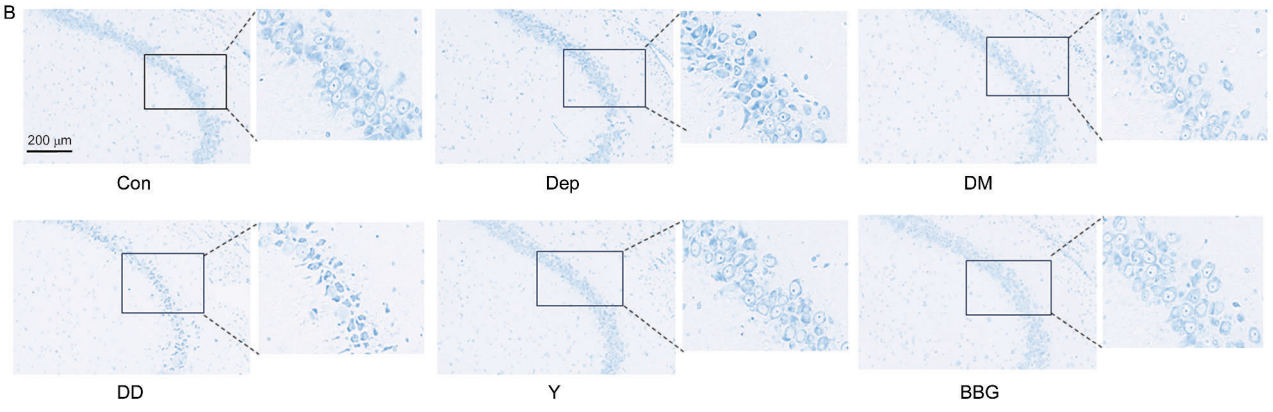


图 6 各组大鼠海马 HE 染色和尼氏染色结果($n=3$)

5 透射电镜

透射电镜结果表明,与 Con 组比较,Dep 和 DD 组大鼠海马神经元呈现明显的突触损伤形态结构特征,突触亚微结构、突触囊泡模糊不清,突触后致密变薄;与 DD 组比较,阳性药和 BBG 均能显著改善或逆转糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经元突触超微结构损伤(见图 7)。

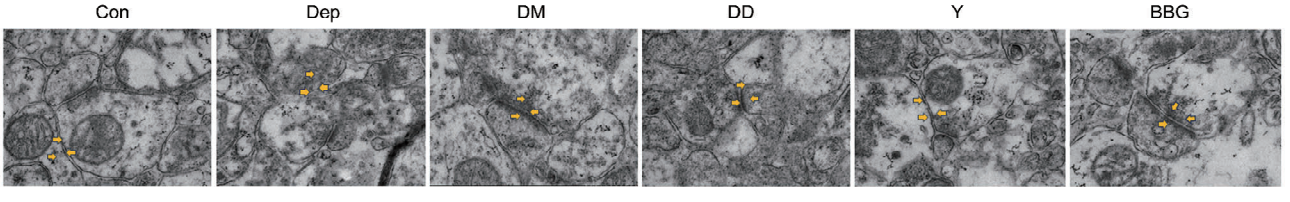
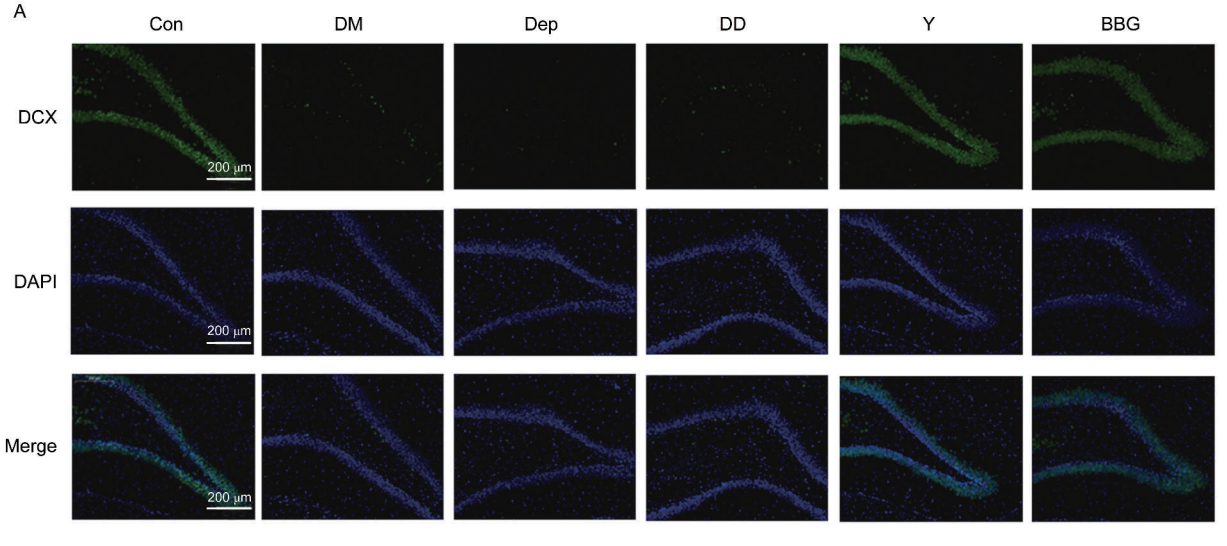
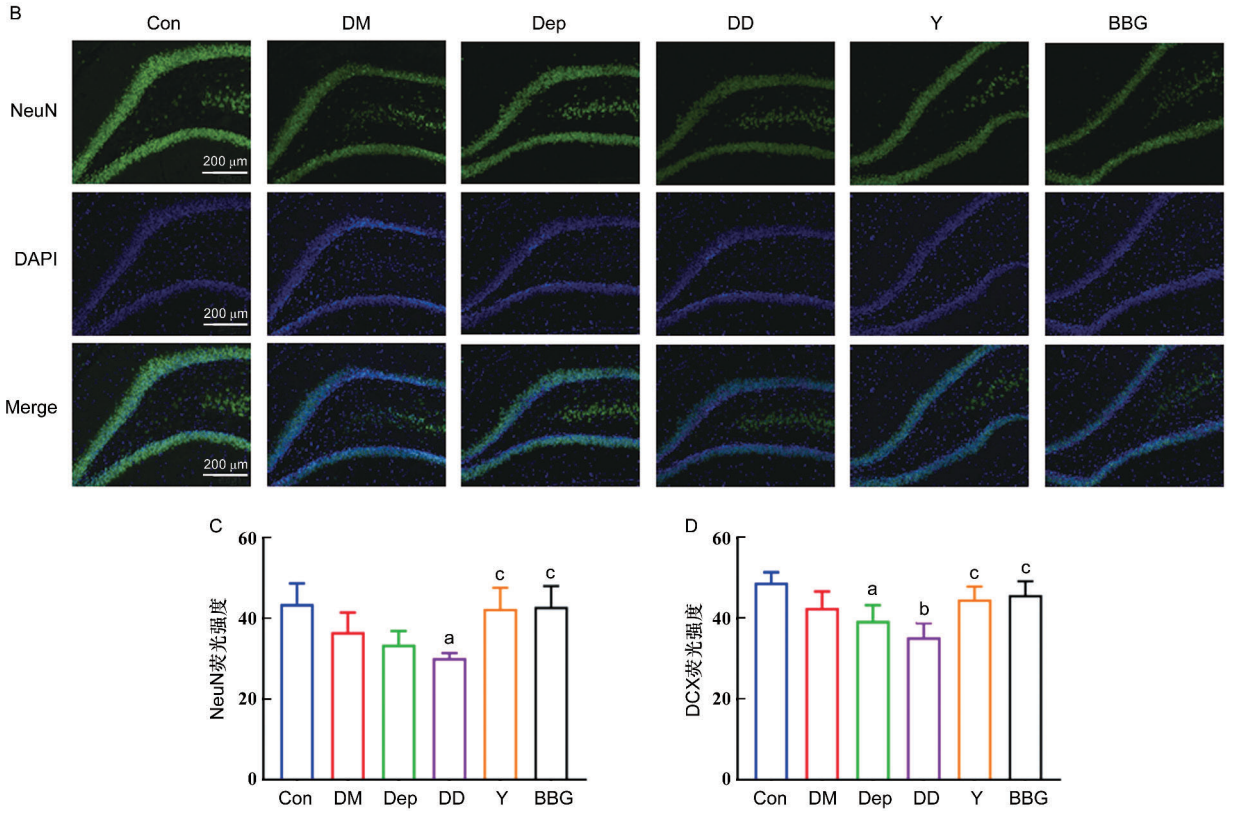


图 7 海马突触可塑性的超微结构指标

6 对 DD 大鼠海马成体海马神经发生的保护作用

与 Con 组相比,DD 组大鼠海马齿状回 NeuN 表达显著降低($P<0.05$),Dep 组和 DD 组大鼠海马齿状回 DCX 表达显著降低($P<0.05$、$P<0.01$);与 DD 组相比,阳性药和 BBG 组大鼠海马齿状回 NeuN 和 DCX 蛋白表达显著升高($P<0.05$),见图 8。



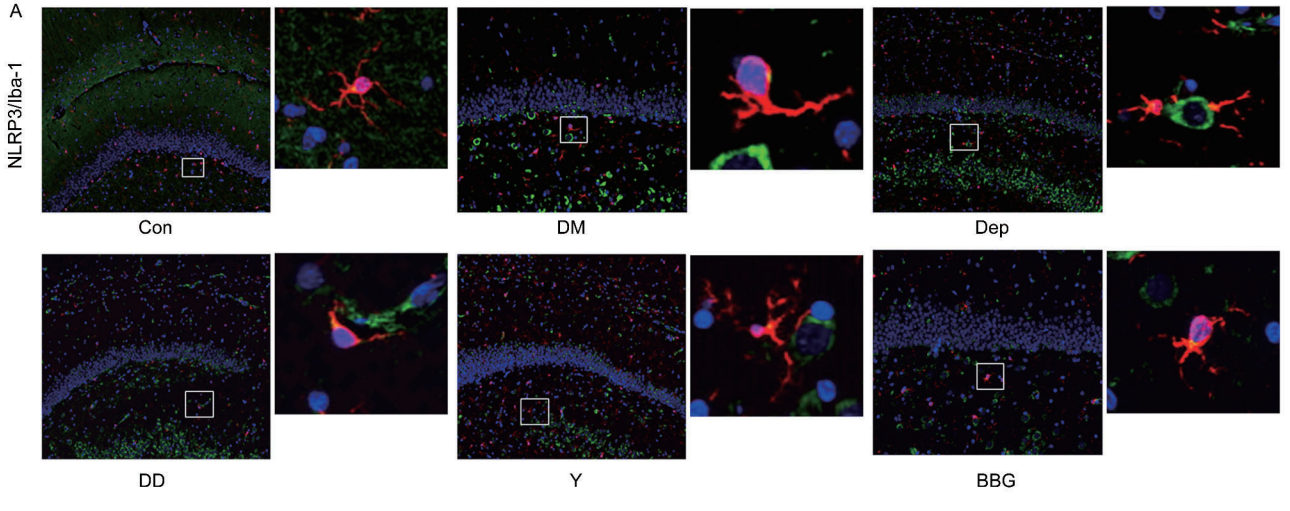


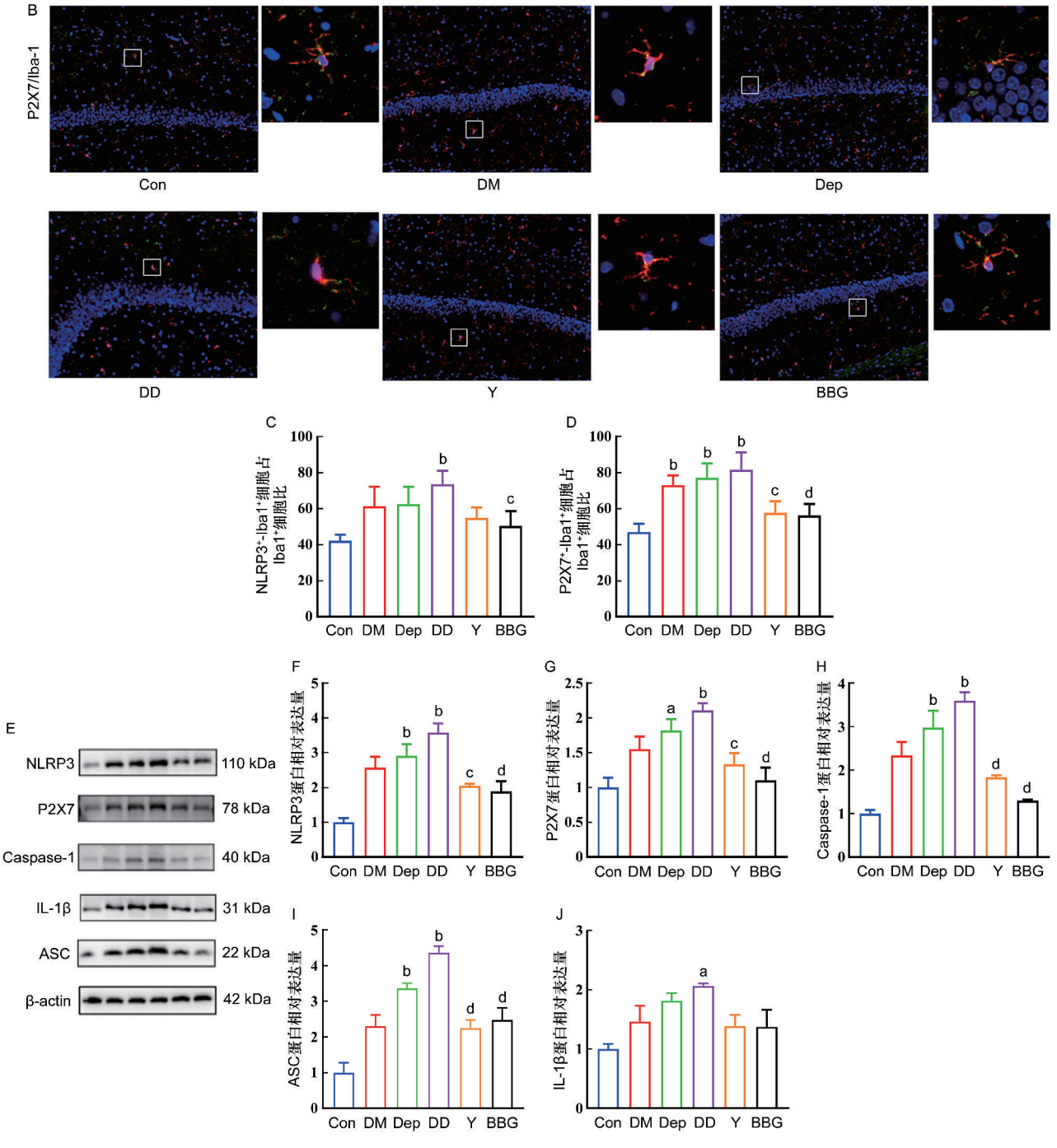
A:DCX 免疫荧光强度;B:NeuN 免疫荧光强度;与 Con 组相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;与 DD 组相比,c:$P<0.05$,d:$P<0.01$

图 8 各组大鼠海马 DG 区 DCX 和 NeuN 的表达情况($n=3$)

7 对 DD 大鼠 P2X7/NLRP3 通路的影响

对大鼠海马中 Iba1/NLRP3 和 Iba1/P2X7 进行免疫荧光和 Western blot 检测,以评估 BBG 对神经炎症的影响。结果显示,与 Con 组相比,DD 组大鼠海马 Iba1 + NLRP3、Iba1 + P2X7 共表达显著升高。与 DD 组比较,阳性药组和 BBG 组大鼠海马 NLRP3、P2X7 表达程度不同程度降低,小胶质细胞分支增多。大鼠的海马小胶质细胞(microglia,MG)激活,胞体呈圆形且相对增大、突起减少甚至消失,给予 P2X7R 抑制剂后 MG 形态得到一定改善,提示 BBG 可能通过减轻神经炎症反应来保护海马神经元,改善神经可塑性损伤(见图 9A ~ 图 9D)。





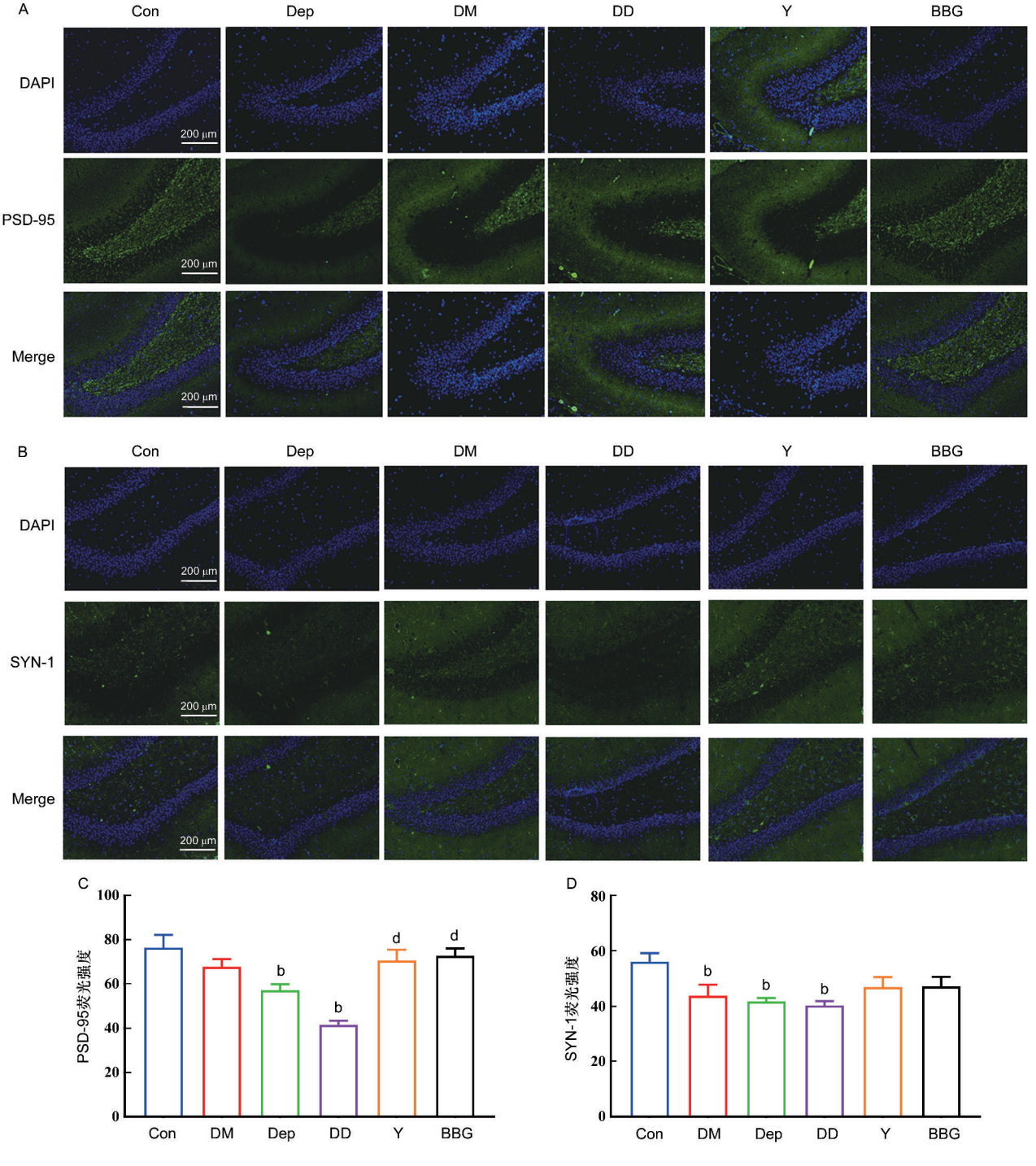
A:NLRP3 免疫荧光强度;B:P2X7 免疫荧光强度;与 Con 组相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;与 DD 组相比,c:$P<0.05$,d:$P<0.01$

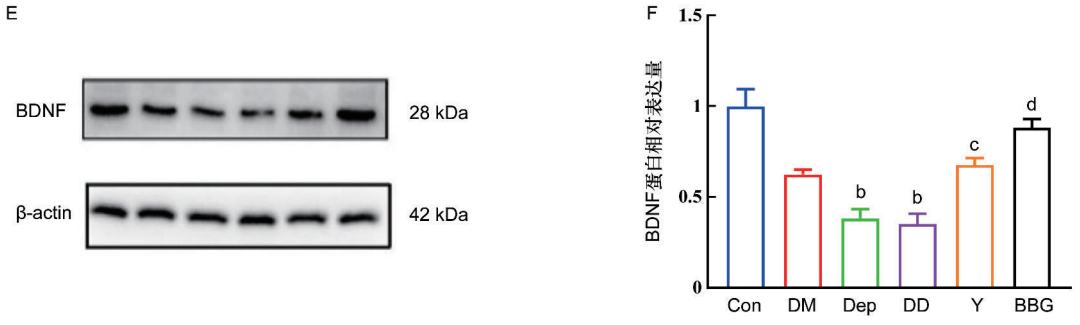
图 9 各组大鼠 P2X7/Iba-1 和 NLRP3/Iba-1 荧光表达情况($n=3$)

Western blot 结果表明,与 Con 组相比,Dep 组和 DD 组大鼠海马 P2X7、NLRP3、IL-1β、ASC、caspase-1 信号通路相关蛋白表达均显著上升($P<0.01$、$P<0.05$)。与 DD 组比较,阳性药和 BBG 组海马 P2X7、NLRP3、ASC、caspase-1 蛋白表达水平显著下降($P<0.01$、$P<0.05$)。结果表明,DD 组大鼠的 P2X7/NLRP3 的炎症信号通路过度激活,说明神经炎症可能是 DD 共病的机制之一。并且给予 P2X7 抑制剂后 P2X7/NLRP3 信号通路过度激活的情况都得到了不同程度的逆转,提示 BBG 能抑制 NLRP3 信号通路过度激活(见图 9E ~ 图 9J)。

8 对 DD 大鼠海马突触可塑性相关蛋白的影响

与 Con 组相比，Dep 组和 DD 组大鼠海马突触前膜标志蛋白 SYN 和突触后膜蛋白 PSD-95 表达均显著下降（$P<0.01$），提示突触结构损伤；与 DD 组相比，阳性药组和 BBG 抑制剂组海马 PSD-95 表达均显著上调（$P<0.01$），SYN 表达增加但无显著差异。另外，星形胶质细胞在神经系统中有营养作用，其主要分泌 BDNF 对突触结构保护具有重要作用。如图 10 所示，与 Con 组比较，Dep 组和 DD 组海马中 BDNF 蛋白表达水平显著下降（$P<0.01$）；与 DD 组相比，Y 组和 BBG 抑制剂组 BDNF 蛋白表达均显著上调。因此，BBG 抑制剂对糖尿病并发抑郁症大鼠海马突触结构具有保护作用。





A:免疫荧光法检测海马 PSD-95 水平;B:定量 SYN 平均荧光强度;C:免疫荧光法检测海马 SYN 水平;D:定量 PSD-95 平均荧光强度;E,F:Western blot 检测海马 BDNF 蛋白表达;与 Con 组相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;与 DD 组相比,c:$P<0.05$,d:$P<0.01$

图 10 各组大鼠突触可塑性相关蛋白水平比较($n=3$)

讨　论

P2X7 在神经炎症过程中具有活性,与 MDD、精神分裂症、癫痫和神经退行性疾病密切相关,因此 P2X7 被认为是治疗精神障碍的潜在靶点(例如帕金森病和阿尔茨海默病)[18-20]。本研究的主要目的是探索 P2X7 拮抗剂 BBG 作用在大鼠从 CUMS 诱导的抑郁样状态恢复中的作用及对神经炎症、神经可塑性(含神经发生、突触可塑性等)的改善作用。CUMS 方案包括将大鼠暴露于轻度社会和环境应激源数周,并在期间以及之后测量该方案的行为和神经生物学效应。本研究结果证明了抑郁样行为、神经炎症和神经可塑性的破坏是暴露于 CUMS 的原因,CUMS 诱导的行为缺陷还伴随着大鼠脑中活化的小胶质细胞中 P2X7 表达的增加,而给予阳性药和 BBG 可以逆转上述现象。

ATP 门控嘌呤能 P2X7R 是一种离子通道受体,主要表达在免疫细胞如小胶质细胞的膜上。它充当 CNS 中神经炎症的看门人,其随后介导 NLRP3 炎性体激活和炎性细胞因子释放[21]。先前的研究观察到抑郁大鼠中 P2X7R 表达增加[22]。此外,P2X7R 拮抗剂是抗炎药物候选者[23]。例如:小鼠 *P2X7* 基因的缺失也导致抗抑郁治疗的反应改善,导致抗抑郁药特征的 *P2X7* 基因的遗传缺失,也导致脑神经传递和蛋白质表达以及神经发生的变化,通过以剂量依赖性方式用 P2X7R 拮抗剂 BBG 进行腹腔注射,再现了转基因 $P2X7^{-/-}$ 小鼠表现出的抗抑郁表型[24-25]。

本研究支持 BBG 对神经可塑性损伤的保护作用,改善了 CUMS 所致大鼠海马损伤,并揭示了 BBG 在 CUMS 诱导的炎症反应中的分子机制:BBG 可能通过抑制海马区域小胶质细胞激活,进而抑制 P2X7R 的激活和上调,从而抑制下游炎症信号通路,显著降低 NLRP3、caspase-1 和 IL-1β 等关键炎症因子的表达,最终改善认知功能。这些发现进一步强化了靶向 P2X7R 通路在缓解神经炎症和促进神经可塑性恢复方面的治疗价值。

然而,在解读本研究结果并评估其潜在临床意义时,仍具有一定局限性:首先,CUMS 模型虽然是研究抑郁样行为和神经炎症的经典范式,但其效应高度依赖于动物的个体差异和对特定应激源的敏感性,这可能导致部分动物反应不充分或不典型,影响结果的均一性。其次,尤其当探讨合并症(如 DD)的机制时需注意,若采用 STZ 诱导的糖尿病模型,其主要模拟的是 1 型糖尿病的病理特征;而临床上与抑郁共病更普遍的是 2 型糖尿病,两者在胰岛素抵抗、代谢紊乱和炎症特征上存在显著差异。尽管如此,本研究在 CUMS 模型框架内清晰地阐明了 BBG 通过靶向 P2X7R-NLRP3 炎症轴抑制神经炎症、修复神经可塑性和改善认知功能的作用机制,为 P2X7R 作为治疗抑郁及相关神经精神障碍的潜在靶点提供了有力的临床前证据。

[参 考 文 献]

[1] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, *et al*. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.

[2] FANELLI G, RASCHI E, HAFEZ G, *et al*. The interface of depression and diabetes: treatment considerations[J]. *Transl Psychiatry*, 2025, 15(1): 22.

[3] FERRARI AJ, CHARLSON FJ, NORMAN RE, *et al*. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010[J]. *PLoS Med*,

2013, 10(11): e1001547.
[4] DIABETES CANADA CLINICAL PRACTICE GUIDELINES EXPERT COMMITTEE, PUNTHAKEE Z, GOLDENBERG R, *et al*. Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome[J]. *Can J Diabetes*, 2018, 42(Suppl 1): S10 – S15.
[5] ZANOVELI JM, DE MORAIS H, DA SILVA DIAS IC, *et al*. Depression associated with diabetes: from pathophysiology to treatment[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2016, 12(3): 165 – 178.
[6] CHAMPANERI S, WAND GS, MALHOTRA SS, *et al*. Biological basis of depression in adults with diabetes[J]. *Curr Diab Rep*, 2010, 10(6): 396 – 405.
[7] KAUSHIK DK, GUPTA M, KUMAWAT KL, *et al*. NLRP3 inflammasome: key mediator of neuroinflammation in murine Japanese encephalitis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32270.
[8] MATURANA CJ, AGUIRRE A, SÁEZ JC. High glucocorticoid levels during gestation activate the inflammasome in hippocampal oligodendrocytes of the offspring[J]. *Dev Neurobiol*, 2017, 77(5): 625 – 642.
[9] FREEMAN L, GUO HT, DAVID CN, *et al*. NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes[J]. *J Exp Med*, 2017, 214(5): 1351 – 1370.
[10] THUNDYIL J, LIM KL. DAMPs and neurodegeneration[J]. *Ageing Res Rev*, 2015, 24(pt a): 17 – 28.
[11] MANGAN MSJ, OLHAVA EJ, ROUSH WR, *et al*. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(8): 588 – 606.
[12] GIULIANI AL, SARTI AC, FALZONI S, *et al*. The P2X7 receptor-interleukin-1 liaison[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 123.
[13] BHATTACHARYA A, JONES DNC. Emerging role of the P2X7-NLRP3-IL1β pathway in mood disorders[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, 98: 95 – 100.
[14] LI ZR, HAN YS, LIU Z, *et al*. GR/NF-κB signaling pathway regulates hippocampal inflammatory responses in diabetic rats with chronic unpredictable mild stress[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 895: 173861.
[15] 刘洋, 李萍, 杨蕙, 等. 左归降糖解郁方改善糖尿病并发抑郁症大鼠 *N*-甲基 *D*-天冬氨酸受体过激致海马突触损伤的作用机制[J]. 中草药, 2023, 54(19): 6323 – 6335.
[16] YANG H, LING J, MENG P, *et al*. Activation of hippocampal IR/IRS-1 signaling contributes to the treatment with Zuogui Jiangtang Jieyu decoction on the diabetes-related depression[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6688723.
[17] LI P, WANG TT, GUO HP, *et al*. Pramipexole improves depression-like behavior in diabetes mellitus with depression rats by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation and preventing impaired neuroplasticity[J]. *J Affect Disord*, 2024, 356: 586 – 596.
[18] BURNSTOCK G, KNIGHT GE. The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression[J]. *Purinergic Signal*, 2018, 14(1): 1 – 18.
[19] BHATTACHARYA A, BIBER K. The microglial ATP-gated ion channel P2X7 as a CNS drug target[J]. *Glia*, 2016, 64(10): 1772 – 1787.
[20] BHATTACHARYA A. Recent advances in CNS P2X7 physiology and pharmacology: focus on neuropsychiatric disorders[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 30.
[21] DI VIRGILIO F, BEN DD, SARTI AC, *et al*. The P2X7 receptor in infection and inflammation[J]. *Immunity*, 2017, 47(1): 15 – 31.
[22] FAROOQ RK, TANTI A, AINOUCHE S, *et al*. A P2X7 receptor antagonist reverses behavioural alterations, microglial activation and neuroendocrine dysregulation in an unpredictable chronic mild stress (UCMS) model of depression in mice[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, 97: 120 – 130.
[23] ADINOLFI E, GIULIANI AL, DE MARCHI E, *et al*. The P2X7 receptor: a main player in inflammation[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 151: 234 – 244.
[24] BASSO AM, BRATCHER NA, HARRIS RR, *et al*. Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders[J]. *Behav Brain Res*, 2009, 198(1): 83 – 90.
[25] CSÖLLE C, BARANYI M, ZSILLA G, *et al*. Neurochemical changes in the mouse hippocampus underlying the antidepressant effect of genetic deletion of P2X7 receptors[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66547.

编辑:毕晓帆/接受日期:2025 – 08 – 22