

## 基于斑马鱼模型和 16S rRNA 微生物多样性测序技术探讨黄芩素抗焦虑作用

赵可欣, 葛 杨, 马阳光, 娜穆拉, 董 武, 康桂英, 于建华\*

内蒙古民族大学动物科技学院, 内蒙古 通辽 028000

**摘要:** 目的 基于斑马鱼模型研究黄芩素的抗焦虑作用。方法 将斑马鱼分为对照组、模型组、黄芩素组和地西洋组, 除对照组外, 其余各组均通过不可预期慢性应激 (unpredictable chronic stress, UCS) 诱导斑马鱼焦虑模型。给予药物干预后, 通过新缸测试检测斑马鱼的行为学变化; 采用 ELISA 测定应激反应生物标志物皮质醇和脑组织神经递质 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 水平; 采用 qRT-PCR 检测脑组织 5-HT 合成限速酶色氨酸羟化酶 2 (tryptophan hydroxylase 2, *TPH2*)、5-羟色胺 1a 受体 (5-hydroxytryptamine 1a receptors, *5-HT<sub>1a</sub>R*)、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , *IL-1 $\beta$* )、核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, *NF- $\kappa$ B*) 和肠道 *IL-1 $\beta$* 、*IL-6*、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , *TNF- $\alpha$* )、*NF- $\kappa$ B* 的基因表达; 采用 Western blotting 检测脑组织 5-羟色胺 1A 受体 (5-hydroxytryptamine 1A receptors, *5-HT<sub>1A</sub>R*) 的蛋白表达; 采用 16S rRNA 微生物多样性测序技术对肠道菌群组成进行检测分析。结果 UCS 处理后斑马鱼产生焦虑样行为, 肠道菌群物种总数和多样性减少, 气单胞菌属 *Aeromonas* 比例增加。与模型组比较, 黄芩素干预后斑马鱼在水缸底部的停留时间显著减少 ( $P < 0.001$ ), 皮质醇水平显著降低 ( $P < 0.001$ ), 脑组织 5-HT 水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), 脑组织 *TPH2* 基因表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), 脑组织 *IL-1 $\beta$* 、*NF- $\kappa$ B* 和肠道 *IL-1 $\beta$* 、*IL-6*、*TNF- $\alpha$* 、*NF- $\kappa$ B* 基因表达显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 脑组织 *5-HT<sub>1A</sub>R* 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ), 肠道菌群物种丰富度和多样性增加, 2 mg/L 黄芩素组脑组织 *5-HT<sub>1a</sub>R* 基因表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 1、4 mg/L 黄芩素组脑组织 *5-HT<sub>1a</sub>R* 基因表达显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )。结论 黄芩素对 UCS 诱导的斑马鱼焦虑样行为有一定保护作用, 其可能是通过抗炎和调节肠道菌群, 抑制斑马鱼皮质醇的过量产生, 维持 5-HT 的正常分泌而发挥抗焦虑作用。

**关键词:** 黄芩素; 斑马鱼; 焦虑; 炎症; 肠道菌群; 皮质醇; 5-羟色胺

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)06-2158-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.06.014

## Anti-anxiety effect of baicalein based on zebrafish model and 16S rRNA microbial diversity sequencing technology

ZHAO Kexin, GE Yang, MA Yangguang, NA Mula, DONG Wu, KANG Guiying, YU Jianhua

School of Animal Science and Technology, Inner Mongolia MinZu University, Tongliao 028000, China

**Abstract: Objective** To study the anti-anxiety effect of baicalein based on zebrafish model. **Methods** The zebrafish were divided into control group, model group, baicalein group and diazepam group. Except for the control group, all other groups underwent the induction of a zebrafish anxiety model through unpredictable chronic stress (UCS). After drug intervention, the behavior changes of zebrafish were evaluated through novel tank test. ELISA was used to measure the levels of stress response biomarkers cortisol and brain neurotransmitter serotonin 5-hydroxytryptamine (5-HT). qRT-PCR was employed to detect the gene expressions of tryptophan hydroxylase 2 (*TPH2*), a rate-limiting enzyme for 5-HT synthesis in brain tissue, 5-hydroxytryptamine 1a receptors (*5-HT<sub>1a</sub>R*), interleukin-1 $\beta$  (*IL-1 $\beta$* ), nuclear factor- $\kappa$ B (*NF- $\kappa$ B*), as well as intestinal *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, tumor necrosis factor- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ) and *NF- $\kappa$ B*. Western blotting was used to detect the protein expressions of 5-hydroxytryptamine 1A receptors (*5-HT<sub>1A</sub>R*) in brain tissue. The composition of intestinal microbiota was analyzed using 16S rRNA microbial diversity sequencing technology. **Results** After UCS treatment, zebrafish exhibited anxiety-like behavior, with a decrease in the total number and diversity of intestinal microbiota species,

收稿日期: 2025-10-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (22566026); 内蒙古自治区高等学校科学技术研究项目 (NJZY23097); 内蒙古自治区自然科学基金资助项目 (2023LHMS08076)

作者简介: 赵可欣, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: zkxxuanyu@163.com

\*通信作者: 于建华, 教授, 博士, 研究方向为中药药理学。E-mail: yjhyjh926@163.com

and an increase in the proportion of *Aeromonas*. Compared with model group, after intervention with baicalein, the dwell time of zebrafish at the bottom of the tank was significantly reduced ( $P < 0.001$ ), cortisol level was significantly decreased ( $P < 0.001$ ), 5-HT level in brain tissue was significantly increased ( $P < 0.001$ ), gene expression of *TPH2* in brain tissue was significantly increased ( $P < 0.05$ ), gene expressions of *IL-1 $\beta$* , *NF- $\kappa$ B* in brain tissue and *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *NF- $\kappa$ B* in intestine were significantly decreased ( $P < 0.05$ , 0.01, 0.001), the protein expression of 5-HT<sub>1A</sub>R in brain tissue was decreased ( $P < 0.001$ ), species richness and diversity of intestinal microbiota species were increased, the gene expression of *5-HT<sub>1ab</sub>R* in brain tissue was significantly reduced in 2 mg/L baicalein group ( $P < 0.01$ ), while the gene expression of *5-HT<sub>1ab</sub>R* in brain tissue was significantly increased in 1, 4 mg/L baicalein groups ( $P < 0.05$ , 0.001). **Conclusion** Baicalein has a certain protective effect on UCS-induced anxiety-like behavior in zebrafish, which may be achieved by anti-inflammatory and regulating gut microbiota, inhibiting excessive production of cortisol in zebrafish, maintaining normal secretion of 5-HT, and exerting anti-anxiety effects.

**Key words:** baicalein; zebrafish; anxiety; inflammation; intestinal microbiota; cortisol; 5-hydroxytryptamine

焦虑症是一种使人衰弱的精神疾病，常与其他疾病并发，随着病情的发展还可能诱发其他精神疾病，全球因焦虑造成的经济损失逐年增加<sup>[1-2]</sup>。焦虑症的发病原因复杂，应激是诱发焦虑的原因之一。临床上常见治疗药物有选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂、苯二氮草类和单胺氧化酶抑制剂类等<sup>[3]</sup>。然而，当前治疗药物存在治疗效果不佳、不良反应明显及停药反应严重等弊端<sup>[1]</sup>。从天然药物中研究开发不良反应小的抗焦虑活性物质具有重要意义。

黄芩素是从黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 根部提取的活性最高的黄酮类化合物之一，能够穿过血脑屏障，具有安全剂量高、耐受性良好的优点，在刺激神经发育和神经营养因子合成、对抗氧化应激和炎症以及调节肠道菌群方面也具有一定效果<sup>[4-5]</sup>。研究发现，焦虑症患者常伴有肠道菌群失调、微生物-肠-脑轴受到破坏现象，肠道菌群失调会促进炎症因子升高<sup>[2]</sup>。黄芩素可以通过降低脑组织肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和 IL-6 的 mRNA 和蛋白表达水平发挥神经保护作用，还能减轻小鼠和斑马鱼的焦虑样行为，其作用机制可能与 5-羟色胺能系统有关，但具体调节机制尚未明确<sup>[6-9]</sup>。

斑马鱼具有与人类相似的神经递质系统和较高的遗传同源性，在神经行为研究方面具有一定优势<sup>[10]</sup>。许多应用于啮齿动物的焦虑模型构建方法经过调整优化后成功应用于斑马鱼，在行为学和生化检测中斑马鱼表现出与啮齿动物高度的相似性，且使用斑马鱼构建焦虑模型耗时比啮齿动物时间短<sup>[11]</sup>。斑马鱼的下丘脑-垂体-肾间腺 (hypothalamic-pituitary-interrenal, HPI) 轴与人类的下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 轴有相似的

功能和结构，能够协调生物体对应激的适应性反应，控制机体皮质醇的水平<sup>[12]</sup>。本研究通过不可预期慢性应激 (unpredictable chronic stress, UCS) 诱导斑马鱼焦虑模型，使用 16S rRNA 微生物测序技术从微生物和炎症因子角度研究黄芩素对斑马鱼的抗焦虑作用，为黄芩素的进一步开发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 动物

野生型 AB 系雄性斑马鱼 (5 月龄)，购自山东一溪月生物科技有限公司。将斑马鱼以每升水 2 条鱼的最大密度饲养，并在正式实验前适应性饲养 2 周。水温维持在 28 °C，pH 7.8~8.0，在 14h 光照/10h 黑暗循环条件下饲养，每天饲喂 2 次。实验用斑马鱼遵循内蒙古民族大学动物伦理规范 (批准号 NMD-DW-2025-11-35)。

### 1.2 药品与试剂

黄芩素对照品 (质量分数为 98%，批号 MKCR0734) 购自德国达姆施塔特默克集团；甲醇中地西洋溶液 (批号 91274JA) 购自天津津南科信生物科技公司；二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 34240611008)、全蛋白提取试剂盒 (强, 批号 240005002) 购自上海索莱宝生物技术有限公司；甲醇 (批号 RH635496) 购自上海易恩化学技术有限公司；斑马鱼皮质醇 ELISA 试剂盒 (批号 MM9156102)、斑马鱼 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) ELISA 试剂盒 (批号 MM9162102) 购自江苏酶免实业有限公司；逆转录试剂 (批号 AMG1372A)、Real Time PCR 试剂 (批号 AO41904A)、4 $\times$  Protein SDS PAGE Loading Buffer (批号 AO30796A) 购自宝日生物技术 (北京) 有限公司；BCA 蛋白测定试剂盒 (批号 Z957240906)、SDS-PAGE 电泳液 (批号

020323240226)、BeyoECL Star 试剂盒(批号 Z902240918)购自上海碧云天生物技术有限公司; AGE 彩色凝胶快速配制试剂盒(批号 CR240927)、Tris-Glycine Transfer Buffer(批号 GA2310052)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;  $\beta$ -actin 抗体(批号 lk4417/4)、5-羟色胺 1A 受体(5-hydroxytryptamine 1A receptors, 5-HT<sub>1A</sub>R)抗体(批号 3e53836)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 56j9958)购自江苏亲科生物研究中心有限公司; Western 溶液套装(批号 36624606AZ)购自兰杰柯科技有限公司。

### 1.3 仪器

ANY-maze™动物行为分析系统(美国 Stoelting 公司); 5424R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); NanoDrop2000c 型超微量分光光度计、ABI GeneAmp® 9700 型 PCR 基因扩增仪、实时荧光定量 PCR 系统(qRT-PCR, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); PowerEase 300W PS0301 型电泳仪(美国 Life Technologies 公司); c600 Bioanalytical Imaging System 多功能分子成像系统(美国 Azure Biosystems 公司)。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模与给药

将 180 条野生型 AB 系斑马鱼随机分为对照组、模型组及黄芩素低、中、高剂量(1、2、4 mg/L)<sup>[9,13-14]</sup>组和地西洋(0.16 mg/L)组。每组 30 条,设置 3 个平行,每缸 10 条鱼。参照 Selvaraj 等<sup>[9]</sup>的方法制备斑马鱼焦虑模型,持续刺激 14 d,每日 9:00—18:00 时随机引入 2 次应激源,应激源包括使用鱼网驱赶追逐斑马鱼(8 min),将饲养缸水位降低至斑马鱼暴露背部体壁(2 min),升高饲养缸的温度至 33 °C(30 min),降低饲养缸的温度至 23 °C(30 min),将 10 条斑马鱼转移至 250 mL 烧杯中进行拥挤(50 min),以 30 min 为间隔连续换缸 3 次。

从造模第 8 天开始,给予药物连续干预 7 d。对照组不做任何处理,其余各组每日 8:00 时将斑马鱼轻轻从饲养缸转移至装有 0.05% DMSO 或给药溶液的烧杯中停留 10 min。

### 2.2 行为学测试

将斑马鱼单独转移至测试水缸(35 cm×22.5 cm×27 cm)中,水缸内的水填充到 15 cm 高度,水缸分成均等的上、中、下 3 部分,拍摄 6 min 的

视频,使用 ANY-maze™软件对视频进行分析,记录 6 min 内斑马鱼的总运动距离、各区域的停留时间。在水缸底部停留时间的增加被视为焦虑样行为增加。

### 2.3 皮质醇水平检测

实验结束后,快速捕获斑马鱼,并将其在液氮中冷冻,储存在-80 °C 冰箱中。将斑马鱼匀浆处理,按照 ELISA 试剂盒说明书测定皮质醇水平。

### 2.4 5-HT 水平检测

将斑马鱼放置在冰上麻醉处死,解剖取全脑,将脑组织匀浆处理,按照 ELISA 试剂盒说明书测定 5-HT 水平。

### 2.5 qRT-PCR 分析

提取斑马鱼脑组织和肠道 RNA,检测 RNA 浓度,所有样本 RNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值均>1.8, A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> 值均>1.5,将质量浓度大于 50 ng/μL 的 RNA 样品逆转录成 cDNA 用于 qRT-PCR 分析,检测斑马鱼脑组织色氨酸羟化酶 2(tryptophan hydroxylase 2, TPH2)、5-羟色胺 1a 受体(5-hydroxytryptamine 1a receptors, 5-HT<sub>1a</sub>R)、IL-1 $\beta$ 、核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)和肠道 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 基因表达。以  $\beta$ -actin 作为内参基因,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

### 2.6 Western blotting 检测脑组织 5-HT<sub>1A</sub>R 蛋白表达

称取斑马鱼脑组织,加入裂解液,匀浆后离心,吸取上清液,测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
$\beta$ -actin	F: CCCCAGAGGACAACAATGTA R: TGAGGAGGGCAAAGTGGTAAA
TPH2	F: AGAGGACAACATCCCACAGC R: CAAGCAGTTCATGGCAGGTG
5-HT <sub>1a</sub> R	F: TCTGCCCAACACACCAAACCT R: CGGACAGAAAGGCATCACGA
IL-1 $\beta$	F: ATGGCGAACGTCATCCAAGA R: GAGACCCGCTGATCTCCTTG
IL-6	F: GGTGAGAGACGGAGAGATGGAT R: CACGCTGGAGAAGTTGAACAG
TNF- $\alpha$	F: TCACGCTCCATAAGACCCAG R: GATGTGCAAAGACACCTGGC
NF- $\kappa$ B	F: GGCAGGTGGCGATAGTGT R: GCAGATTCTTCAGTTCTC

硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后洗涤 3 次, 加入一抗, 4 °C 孵育 12 h; 洗涤后加入二抗, 摇床振荡孵育 2 h; 洗涤后, 使用 BeyoECL Star 试剂盒显影, 分析条带灰度值。

### 2.7 肠道菌群分析

实验结束后, 斑马鱼禁食 6 h, 于冰上麻醉解剖, 取肠道放入无菌的离心管内, 液氮速冻, -80 °C 保存。样本经干冰保存后送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 16S rRNA 微生物多样性测序。依次进行基因组 DNA 抽提、PCR 扩增、荧光定量、文库构建, 最后进行测序分析, 分析内容包括肠道菌群的  $\alpha$  多样性分析、 $\beta$  多样性分析、操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 聚类分析和物种分类学分析。

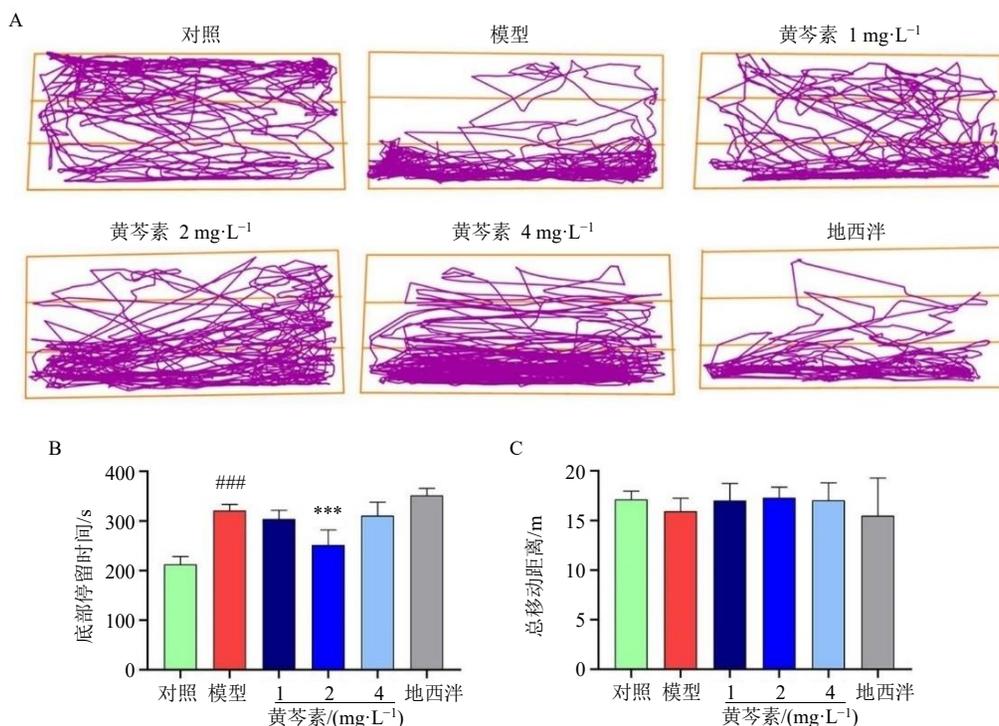
### 2.8 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析比较各组差异, 同时进行 Bonferroni 多重比较检验。

## 3 结果

### 3.1 黄芩素对斑马鱼焦虑模型焦虑样行为的影响

如图 1-A 所示, 模型组斑马鱼在水缸中上部游动轨迹明显少于对照组, 其主要活动轨迹集中在水缸底部, 在水缸底部的停留时间显著增加 ( $P < 0.001$ , 图 1-B); 与模型组比较, 黄芩素干预后斑马鱼在水缸底部的停留时间减少, 其中中剂量组有显著性差异 ( $P < 0.001$ ); 地西洋组斑马鱼在水缸底部的停留时间增加。各组斑马鱼总移动距离没有显著性差异 (图 1-C)。



A-各组斑马鱼的水缸正面游动轨迹图; B-底部停留时间; C-总移动距离; 与对照组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ , 下同。

A-front swimming trajectory map in water tank of zebrafish in each group; B-bottom dwell time; C-total movement distance; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group, same as below figures.

图 1 黄芩素对斑马鱼焦虑模型焦虑样行为的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Fig. 1 Effect of baicalin on anxiety-like behaviour in zebrafish anxiety model ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

### 3.2 黄芩素对斑马鱼焦虑模型皮质醇水平的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼全鱼皮质醇水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 各给药组斑马鱼全鱼皮质醇水平显著降低 ( $P < 0.001$ )。

### 3.3 黄芩素对斑马鱼焦虑模型脑组织 5-HT 水平的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼脑组织 5-HT 水平显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 各给药组脑组织 5-HT 水平显著升高 ( $P < 0.001$ )。

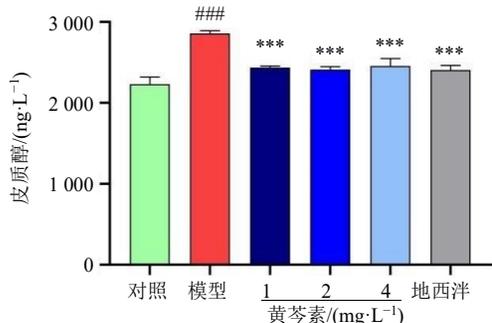


图2 黄芩素对斑马鱼焦虑模型皮质醇水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of baicalein on cortisol level in zebrafish anxiety model ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

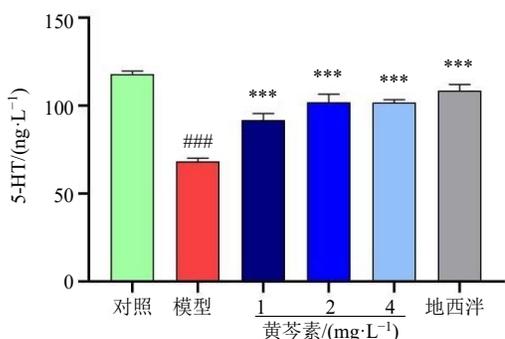


图3 黄芩素对斑马鱼焦虑模型脑组织 5-HT 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of baicalein on 5-HT level in brain tissue of zebrafish anxiety model ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

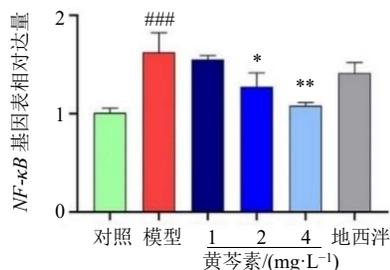
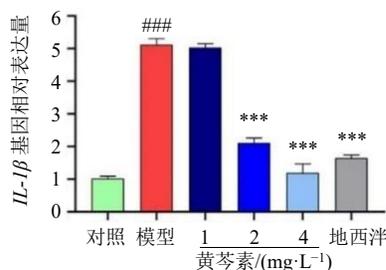
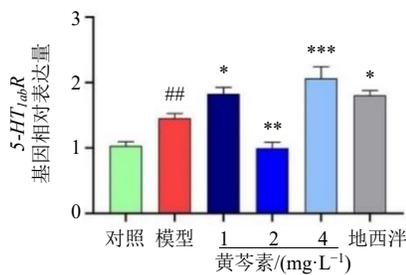
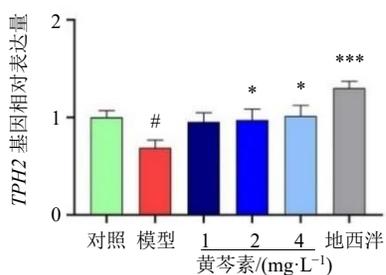


图4 黄芩素对斑马鱼焦虑模型脑组织 *TPH2*、*5-HT<sub>1a</sub>R*、*IL-1β*、*NF-κB* 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of baicalein on gene expressions of *TPH2*, *5-HT<sub>1a</sub>R*, *IL-1β*, *NF-κB* in brain tissue of zebrafish anxiety model ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.4 黄芩素对斑马鱼焦虑模型脑组织 5-HT 相关基因及炎症因子表达的影响

如图4所示,与对照组比较,模型组斑马鱼脑组织 *TPH2* 基因表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), *5-HT<sub>1a</sub>R*、*IL-1β*、*NF-κB* 基因表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。与模型组比较,黄芩素中、高剂量组和地西洋组斑马鱼脑组织 *TPH2* 基因表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ), *IL-1β* 基因表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ );黄芩素中、高剂量组斑马鱼脑组织 *NF-κB* 基因表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ );黄芩素中剂量组斑马鱼脑组织 *5-HT<sub>1a</sub>R* 基因表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ),黄芩素低、高剂量组和地西洋组斑马鱼脑组织 *5-HT<sub>1a</sub>R* 基因表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )。

### 3.5 黄芩素对斑马鱼焦虑模型肠道炎症因子表达的影响

如图5所示,与对照组比较,模型组斑马鱼肠道 *IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α*、*NF-κB* 基因表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ );与模型组比较,各给药组斑马鱼肠道 *IL-1β*、*NF-κB* 基因表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ),黄芩素中、高剂量组和地西洋组斑马鱼肠道 *IL-6* 基因表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ),黄芩素各剂量组斑马鱼肠道 *TNF-α* 基因表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )。

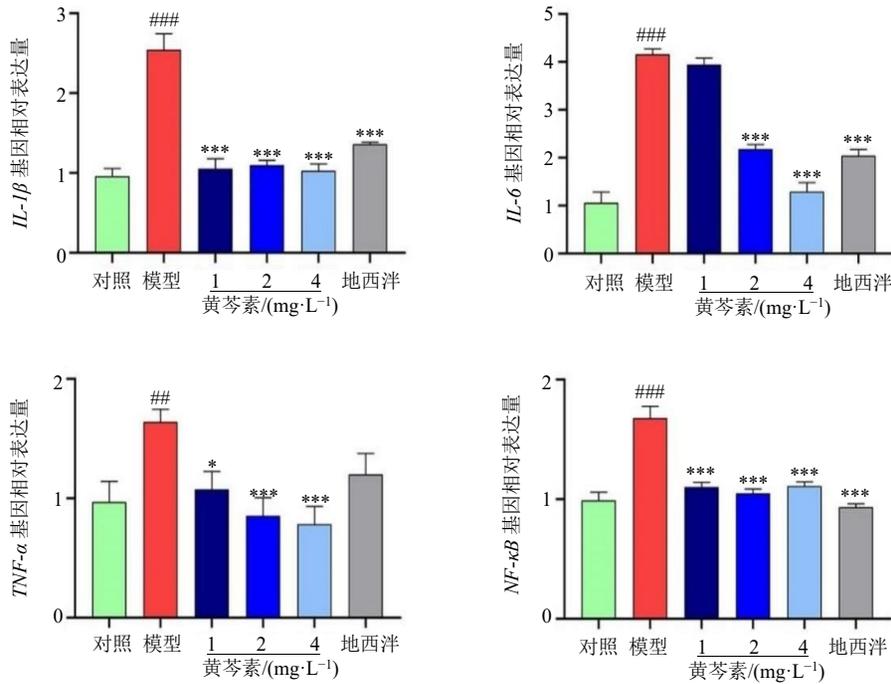


图5 黄芩素对斑马鱼焦虑模型肠道 *IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α*、*NF-κB* 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effect of baicalein on gene expressions of *IL-1β*, *IL-6*, *TNF-α*, *NF-κB* in intestine of zebrafish anxiety mode ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.6 黄芩素对斑马鱼焦虑模型脑组织 5-HT<sub>1A</sub>R 蛋白表达的影响

如图6所示,与对照组比较,模型组斑马鱼脑组织 5-HT<sub>1A</sub>R 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,黄芩素中剂量组斑马鱼脑组织 5-HT<sub>1A</sub>R 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ )。

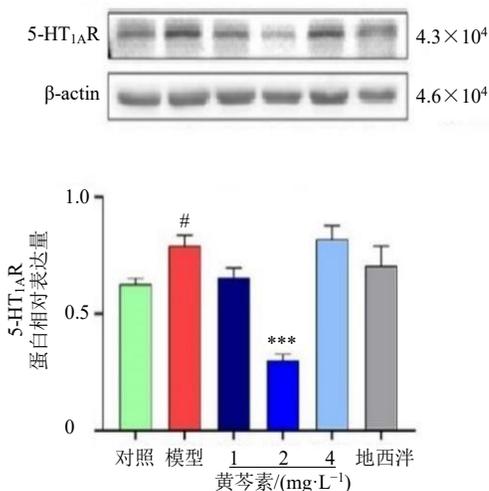


图6 黄芩素对斑马鱼焦虑模型脑组织 5-HT<sub>1A</sub>R 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effect of baicalein on protein expression of 5-HT<sub>1A</sub>R in brain tissue of zebrafish anxiety model ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.7 黄芩素对斑马鱼焦虑模型肠道菌群的影响

如图7所示,与对照组比较,模型组斑马鱼肠道菌群的 Ace、Chao、Sobs、Shannon 指数降低, Simpson 指数升高;与模型组比较,黄芩素高剂量组和地西洋组 Ace、Chao、Sobs 指数升高,黄芩素低剂量组和地西洋组 Shannon 指数升高,黄芩素低剂量组和地西洋组 Simpson 指数降低,黄芩素中、高剂量组 Simpson 指数升高。各组 Coverage 指数没有明显差异。

如图8所示,各组变化显著的前10菌属为鲸杆菌属 *Cetobacterium*、气单胞菌属 *Aeromonas*、芽殖杆菌属 *Gemmobacter*、unclassified\_f\_Rhodobacteraceae、博斯氏菌属 *Bosea*、无色杆菌属 *Achromobacter*、根瘤菌属 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、norank\_f\_Rhizobiales\_Incertae\_Sedis。

如图9所示,与对照组比较,模型组气单胞菌属、希瓦氏菌属 *Shewanella* 相对丰度升高,卤蕨属 *Haloferula*、假黄单胞菌属 *Pseudoxanthomonas*、玫瑰单胞菌属 *Roseomonas*、微红微球菌属 *Rubellimicrobium* 相对丰度降低。与模型组比较,黄芩素各剂量组和地西洋组气单胞菌属相对丰度无显

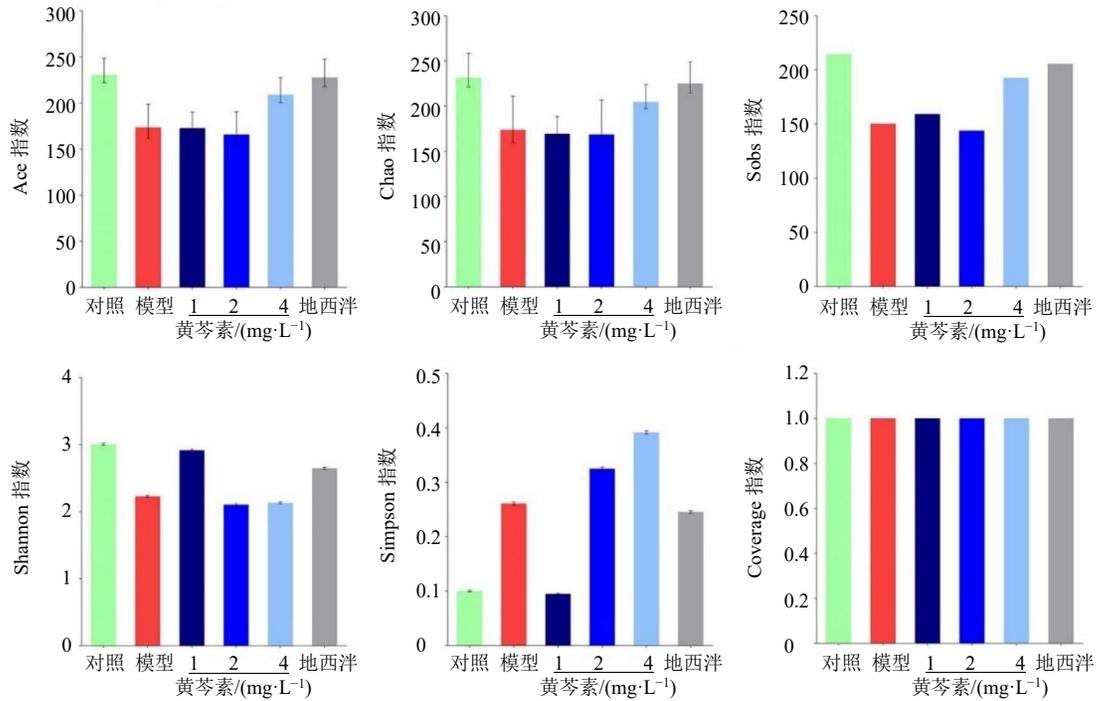


图 7 肠道菌群  $\alpha$  多样性分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Intestinal microbiota  $\alpha$ -diversity analysis ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

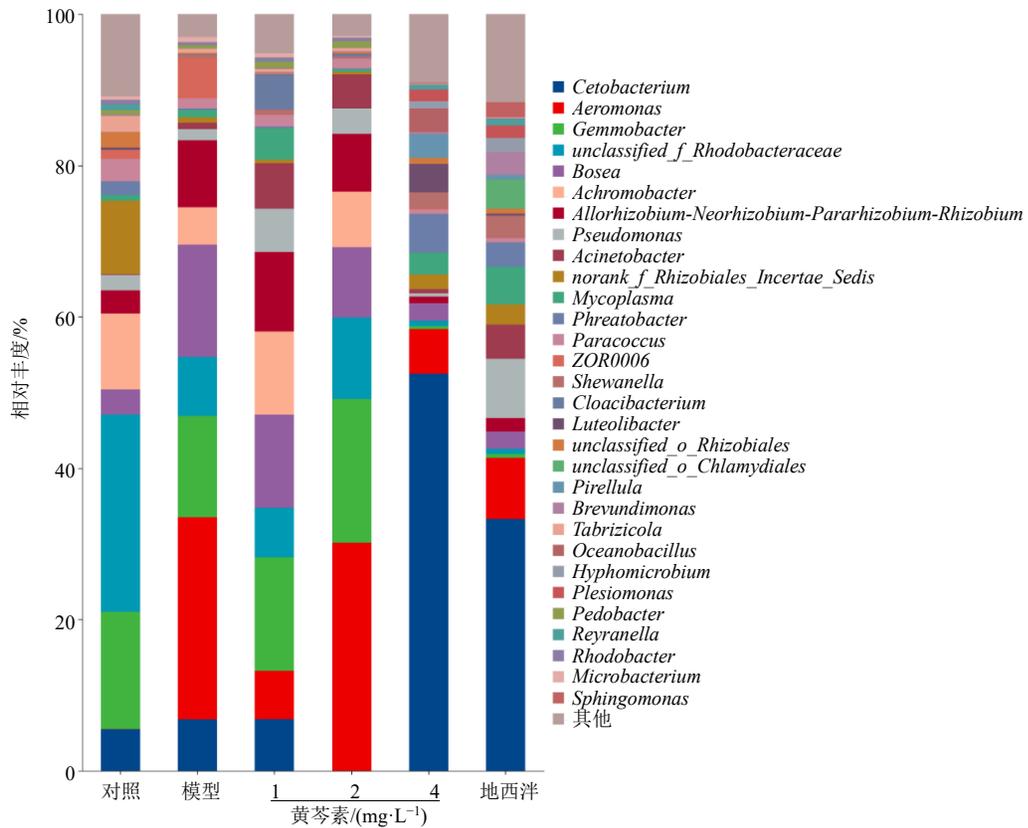
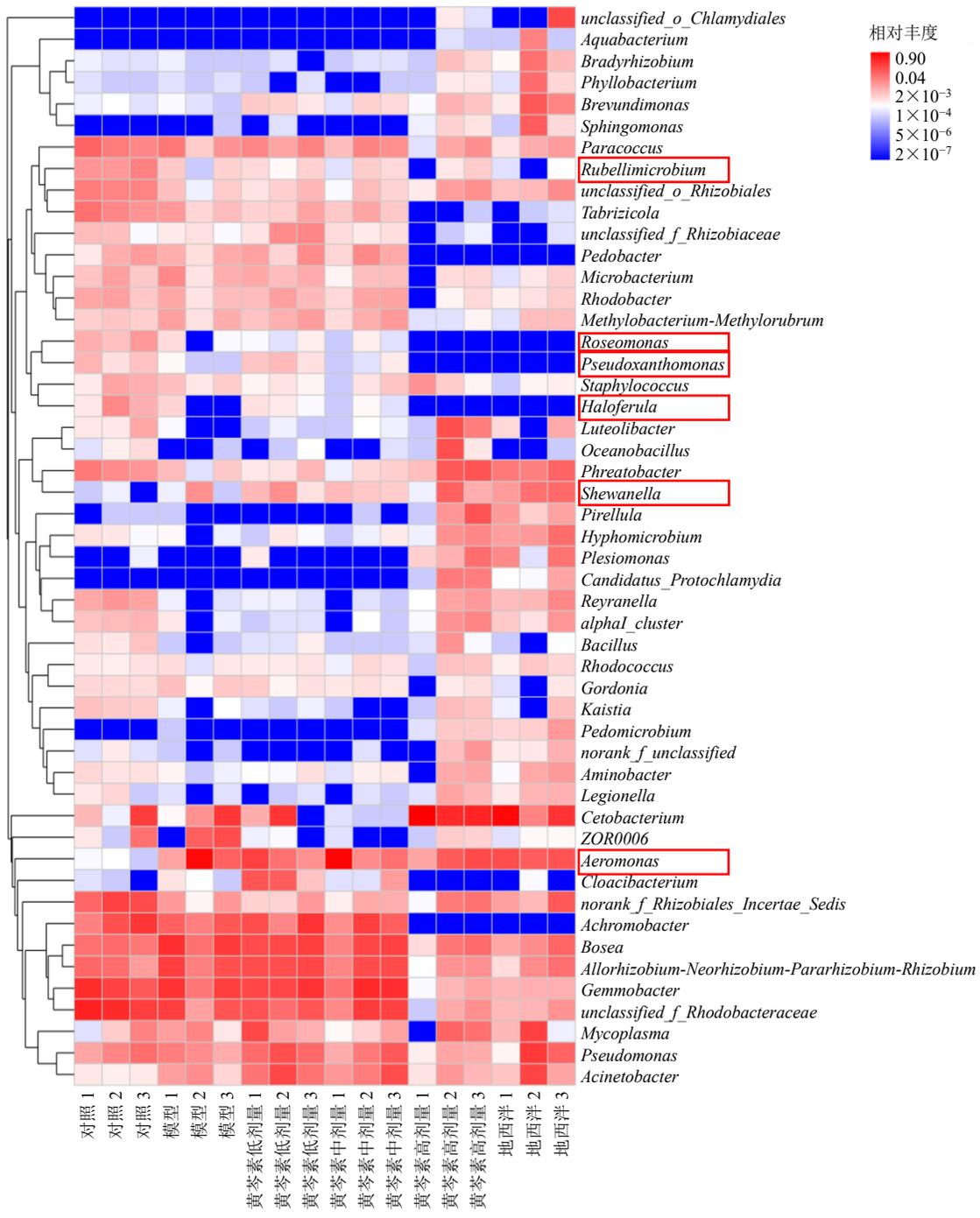


图 8 肠道菌群属水平群落柱形图 ( $n = 3$ )

Fig. 8 Intestinal microbiota column chart of community at genus level ( $n = 3$ )



Bacterial genera marked in red are those that have undergone significant changes after modeling.

图9 肠道菌群属水平群落热图

Fig. 9 Intestinal microbiota community heatmap at genus level

显著变化，希瓦氏菌属相对丰度升高；黄芩素低剂量组卤蕨属、假黄单胞菌属相对丰度升高，玫瑰单胞菌属、微红微球菌属相对丰度无显著变化；黄芩素高剂量组和地西洋组卤蕨属相对丰度无显著变化，假黄单胞菌属、玫瑰单胞菌属、微红微球菌属相对丰度降低。

#### 4 讨论

焦虑症是一种常见的精神疾病，发病时会对体内多个器官产生影响，应激是诱发焦虑的原因之一。Marcon 等<sup>[11]</sup>的研究表明临床使用的抗焦虑药和抗抑郁药能对 UCS 诱导的斑马鱼焦虑模型产生抗焦虑作用，提示斑马鱼能作为筛选临床抗焦虑药的

实验动物。Santos Marques de Carvalho 等<sup>[7]</sup>和 Ruan 等<sup>[8]</sup>的研究表明黄芩素对小鼠具有抗焦虑作用。Selvaraj 等<sup>[9]</sup>发现 1、2 mg/L 的黄芩素增加了斑马鱼在水缸顶部的停留时间,表现出抗焦虑作用。此外,以水生动物卤虫为实验动物检测黄芩素的毒性,结果表明黄芩素的半数致死浓度 (median lethal concentration, LC<sub>50</sub>) 值为 244 μg/mL,黄芩素质量浓度 < 244 μg/mL 时具有良好的生物活性<sup>[9]</sup>; 1、2、3 mg/L 黄芩素未对斑马鱼胚胎产生显著的毒性作用<sup>[13]</sup>; 成年人连续 10 d 每日口服黄芩素咀嚼片 200~800 mg 未产生显著不良反应<sup>[14]</sup>。本研究基于 UCS 诱导斑马鱼焦虑模型考察黄芩素的抗焦虑作用,结果显示,与对照组比较,模型组斑马鱼在水缸底部的活动增多,底部停留时间显著增加,皮质醇水平升高,表明焦虑模型构建成功。与模型组比较,2 mg/L 黄芩素增加了斑马鱼在水缸中上部的活动,减少了在水缸底部的停留时间,提示斑马鱼的焦虑样行为减少,这与 Selvaraj 等<sup>[9]</sup>的研究结果一致。与对照组比较,模型组斑马鱼总移动距离稍有减少,但没有显著性差异,模型组与各给药组间也没有显著性差异,在 Marcon 等<sup>[11]</sup>的研究中 UCS 处理和药物干预没有改变斑马鱼的总移动距离,本研究结果与其相同,提示 UCS 处理和黄芩素干预对斑马鱼的运动能力没有产生显著影响。

除行为学变化外,产生焦虑的斑马鱼机体生化指标也会发生变化。皮质醇是 HPA 轴的主要效应激素,在应激反应中扮演着关键角色,5-HT 是调节情绪、认知和行为的重要神经递质,二者的变化影响着精神健康状态。长期的应激会导致行为发生变化,同时激活 HPA 轴,促进糖皮质激素分泌<sup>[15-16]</sup>。本研究对斑马鱼全鱼皮质醇和脑组织 5-HT 水平变化进行检测,考察黄芩素对皮质醇和 5-HT 的影响。皮质醇是重要的应激反应生物标志物和压力水平生物标志物,其作为主要的糖皮质激素在身体应对压力时被释放<sup>[17-18]</sup>。李小红等<sup>[19]</sup>的研究中焦虑斑马鱼皮质醇水平显著升高,本研究中产生焦虑样行为的斑马鱼皮质醇水平平均升高,黄芩素干预后皮质醇水平降低,表明黄芩素对降低斑马鱼焦虑模型全鱼皮质醇有一定作用。5-HT 是体内常见的神经递质,主要通过与其脑中特定受体结合在情绪调节中发挥作用<sup>[20]</sup>。本研究中,焦虑斑马鱼脑组织 5-HT 水平降低,黄芩素干预后脑组织 5-HT 水平升高,表明黄芩素对升高斑马鱼焦虑模型脑组织 5-HT 水平

有一定作用。对调节脑组织 5-HT 合成的基因 *TPH2* 进行检测后发现,模型组斑马鱼 *TPH2* 表达显著降低,黄芩素干预后 *TPH2* 表达升高;对 5-HT 受体基因 *5-HT<sub>1ab</sub>R* 和蛋白 5-HT<sub>1A</sub>R 的检测显示,模型组斑马鱼 *5-HT<sub>1ab</sub>R* 和 5-HT<sub>1A</sub>R 表达显著升高,2 mg/L 黄芩素干预后 *5-HT<sub>1ab</sub>R* 和 5-HT<sub>1A</sub>R 表达降低。5-HT<sub>1A</sub> 突触前自身受体介导对 5-HT 神经元的负反馈抑制,参与情绪、情感和应激反应的调节,5-HT 水平升高时可能引起 5-HT<sub>1A</sub> 突触前自身受体脱敏,它的脱敏在焦虑症治疗中发挥积极作用,5-HT<sub>1A</sub> 突触后异源受体分布在与情绪和焦虑调节密切相关的大脑区域,其表达受到皮质醇的影响,皮质醇水平升高时 5-HT<sub>1A</sub> 突触后异源受体表达下调,皮质醇可以与转录因子(如 NF-κB)相互作用抑制 *5-HT<sub>1A</sub>* 基因转录的激活,进而调节 5-HT<sub>1A</sub>R 的功能<sup>[21-23]</sup>。黄芩素对调节激素皮质醇和神经递质 5-HT 的水平有一定作用,对增强 *TPH2* 表达也有一定作用, *5-HT<sub>1ab</sub>R* 基因表达和 5-HT<sub>1A</sub>R 蛋白表达的变化可能与皮质醇和 5-HT 水平的变化相关。

本研究中,黄芩素在降低皮质醇水平、升高 5-HT 水平上未遵循线性正相关效应。在降低皮质醇水平方面,高剂量组并没有低、中剂量组作用明显。Piato 等<sup>[12]</sup>研究发现 UCS 处理后皮质激素释放因子表达增强,糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptors, GRs) 表达减少。本研究中 2 mg/L 黄芩素对 GRs 的激活水平可能已经接近峰值,临近最大效应,更高质量浓度的 4 mg/L 黄芩素未能激活更多 GRs,降低皮质醇的效果低于 2 mg/L 黄芩素。同时,也可能与 5-HT 水平有关。在升高 5-HT 水平方面,与模型组比较,1、2、4 mg/L 黄芩素分别升高 1.34、1.49、1.49 倍,4 mg/L 黄芩素和 2 mg/L 黄芩素升高 5-HT 水平效果相同,可能是因为 5-HT 受体的负反馈机制抑制了 5-HT 的合成和释放,4 mg/L 黄芩素在前期增加了 5-HT 水平,5-HT 水平升高后负反馈机制启动,5-HT 受体开始抑制 5-HT 合成和 5-HT 能神经元放电,导致突触间隙的 5-HT 分泌减少,最终表现出与 2 mg/L 黄芩素相同的调节效果<sup>[21-23]</sup>。临床中许多选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂会表现出钟形剂量-反应曲线,在达到最大效应前增加剂量会在一定程度上增强疗效,在达到最大效应后增加剂量会导致疗效降低,更高的剂量不会遵循线性剂量-反应曲线引起更好的疗效<sup>[24]</sup>。黄芩素在调节脑组织神经递质和激素方面可能遵循钟形剂量-反应曲线,黄

芩素可能同时作用于  $\gamma$ -氨基丁酸、5-HT 等多个系统,高浓度下,某些具有兴奋性或抑制性生理效应的靶点可能同时被激活,从而导致对焦虑的治疗效果不如低浓度时显著<sup>[7-8]</sup>。

对斑马鱼肠道菌群的检测和分析显示,经过 UCS 处理的斑马鱼肠道菌群 Ace、Chao、Sobs、Shannon 指数降低,提示肠道菌群物种丰富度和多样性降低;Simpson 指数升高,提示有一种或几种细菌占据主要地位。在肠道菌群属水平群落柱形图和群落热图中能观察到气单胞菌属和希瓦氏菌属相对丰度升高。本研究中斑马鱼肠道中增加的气单胞菌属和希瓦氏菌属都属于致病菌属,可引起水生生物出血性败血症、氧化应激、组织损伤和体内平衡失调,斑马鱼肠道出现炎症反应与以上 2 种菌属的增加密切相关<sup>[25-27]</sup>。致炎菌属增加可能引起正常肠道环境受到破坏,引起肠道菌群失调,然后引起炎症水平进一步升高,研究表明,炎症性肠病患者患有焦虑症的比率非常高,焦虑症患者肠道微生物丰富度和多样性低于健康人群,炎症和肠道菌群在焦虑症的发病中可能有作用<sup>[28-29]</sup>。研究表明,暴露于束缚应激引发焦虑的小鼠炎症因子 IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B 水平升高<sup>[30]</sup>。本研究中模型组斑马鱼脑组织 IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B 基因表达升高,肠道 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 基因表达升高,黄芩素干预后以上炎症因子表达降低,说明黄芩素在一定程度上抑制了炎症因子的过量表达,减轻了炎症反应。

从  $\alpha$  多样性指标上分析,4 mg/L 黄芩素组对肠道菌群调节效果较好,1、2 mg/L 黄芩素组效果相对不显著,可能是因为 4 mg/L 黄芩素组抗炎效果较强,间接的参与了肠道菌群调节。研究发现气单胞菌属与炎症相关,本研究中 4 mg/L 黄芩素干预后,气单胞菌属比例减少,肠道炎症减轻,提示黄芩素可能有利于斑马鱼肠道恢复正常生理平衡,后续需要进行体外共培养、菌群移植等实验,进一步验证黄芩素对特定菌属的抑制作用及其剂量相关性,明确关键菌群在机体炎症和焦虑中的作用。肠道菌群通过神经内分泌和神经免疫系统对脑产生自下而上的沟通,可能通过肠-脑轴影响脑部炎症因子水平,进而对焦虑症的发生产生影响。黄芩素和黄芩苷是黄芩的主要黄酮类活性成分,研究发现,黄芩苷能够降低脑组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平,同时能改变肠道微生物区系的组成<sup>[31]</sup>。本研究中,黄芩素干预后斑马鱼肠道菌群组成和脑组织炎症因子

发生变化,关于肠道菌群组成和脑部炎症因子之间的关系及机制还需要进一步研究。肠道是色氨酸代谢的重要场所,色氨酸是神经递质 5-HT 的前体,在肠道中参与对结肠运动和分泌活动的调节,色氨酸及其代谢产物还支持中枢神经系统和肠神经系统的发育,肠道微生物直接或间接地影响色氨酸代谢,当其组成发生变化时可能引起色氨酸代谢失调,进而对神经系统产生影响,肠道微生物群还可产生多巴胺、 $\gamma$ -氨基丁酸等神经递质,都与情绪调节有关<sup>[29,32]</sup>。本研究使用黄芩素对斑马鱼进行干预后肠道菌群的 Ace、Chao、Sobs、Shannon 指数升高,提示肠道菌群物种丰富度和多样性增多,在肠道菌群属水平群落柱形图中能观察到气单胞菌属比例减少,黄芩素可能通过发挥抗炎作用减轻肠道炎症,降低炎症因子的表达,调节肠道菌群组成,通过微生物-肠-脑轴对脑组织产生影响,进而对与焦虑相关的激素和神经递质产生影响。

本研究中一定质量浓度的黄芩素干预后,改变了斑马鱼在水缸底部的停留时间,降低了皮质醇水平,提高了脑组织 5-HT 水平,增强了脑组织 TPH2 基因表达和调节了肠道菌群组成,改变了斑马鱼焦虑行为。然而本实验也存在一定局限性,在不同检测指标中未表现出一致的剂量-效应关系,各指标的最佳效应剂量并不一致,表现出这种结果的原因尚无明确定论。在此提出一些猜测,黄芩素在体内的不同浓度时会表现出不同的受体亲和性,就像皮质醇在浓度较低时多数与盐皮质激素受体结合,在浓度较高时与糖皮质激素受体结合较多,黄芩素可能有类似机制。浓度较低时对脑组织相关受体亲和性较高,浓度较高时对其他组织亲和性较高。目前,针对此方面的研究仍较为匮乏,这直接制约了对黄芩素的剂量-效应关系的深入理解,未来亟需开展更为系统、深入的探索。下一步,在行为学分析上,需要增加斑马鱼行为学分析实验如明暗实验、Y 迷宫实验等,同时增加焦虑指标分析,从多个维度阐明黄芩素对斑马鱼焦虑行为防护作用的剂量关联性。此外,需要增加黄芩素剂量范围,深入研究药物浓度对斑马鱼神经、内分泌、免疫和微生物变化的影响和机制分析。

综上,黄芩素对 UCS 诱导的斑马鱼焦虑样行为有一定保护作用,其可能是通过抗炎和调节肠道菌群组成,抑制斑马鱼皮质醇的过量产生,维持 5-HT 的正常分泌发挥抗焦虑作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Goodwin G M, Stein D J. Generalised anxiety disorder and depression: Contemporary treatment approaches [J]. *Adv Ther*, 2021, 38(Suppl 2): 45-51.
- [2] Simpson C A, Diaz-Arteche C, Eliby D, *et al.* The gut microbiota in anxiety and depression-A systematic review [J]. *Clin Psychol Rev*, 2021, 83: 101943.
- [3] Strawn J R, Geraciotti L, Rajdev N, *et al.* Pharmacotherapy for generalized anxiety disorder in adult and pediatric patients: An evidence-based treatment review [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2018, 19(10): 1057-1070.
- [4] Chi F Y, Wang W S, Zhai S S, *et al.* Self-assembled baicalein-2,4-decadienal nanomedicine synergistically inhibits PGE<sub>2</sub> expression and elicits anti-inflammatory responses [J]. *Chin Herb Med*, 2025, <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2025.10.001>.
- [5] Song J X, Li M X, Kang N, *et al.* Baicalein ameliorates cognitive impairment of vascular dementia rats via suppressing neuroinflammation and regulating intestinal microbiota [J]. *Brain Res Bull*, 2024, 208: 110888.
- [6] Chen S F, Hsu C W, Huang W H, *et al.* Post-injury baicalein improves histological and functional outcomes and reduces inflammatory cytokines after experimental traumatic brain injury [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 155(8): 1279-1296.
- [7] Santos Marques de Carvalho R, Duarte F S, de Lima T C M. Involvement of GABAergic non-benzodiazepine sites in the anxiolytic-like and sedative effects of the flavonoid baicalein in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 221(1): 75-82.
- [8] Ruan L N, Guan K Y, Wang Y, *et al.* Baicalein exerts anxiolytic and antinociceptive effects in a mouse model of posttraumatic stress disorder: Involvement of the serotonergic system and spinal delta-opioid receptors [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2023, 122: 110689.
- [9] Selvaraj L K, Jeyabalan S, Wong L S, *et al.* Baicalein prevents stress-induced anxiety behaviors in zebrafish model [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 990799.
- [10] Stewart A, Gaikwad S, Kyzar E, *et al.* Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(1): 135-143.
- [11] Marcon M, Herrmann A P, Mocelin R, *et al.* Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline [J]. *Psychopharmacology*, 2016, 233(21/22): 3815-3824.
- [12] Piato Â L, Capiotti K M, Tamborski A R, *et al.* Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2011, 35(2): 561-567.
- [13] Zhang J E, Deng Y Y, Cheng B, *et al.* Protective effects and molecular mechanisms of baicalein on thioacetamide-induced toxicity in zebrafish larvae [J]. *Chemosphere*, 2020, 256: 127038.
- [14] Pang H X, Xue W, Shi A X, *et al.* Multiple-ascending-dose pharmacokinetics and safety evaluation of baicalein chewable tablets in healthy Chinese volunteers [J]. *Clin Drug Investig*, 2016, 36(9): 713-724.
- [15] Juruena M F, Eror F, Cleare A J, *et al.* The role of early life stress in HPA axis and anxiety [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1191: 141-153.
- [16] Mitra R, Sapolsky R M. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(14): 5573-5578.
- [17] Vignesh V, Castro-Dominguez B, James T D, *et al.* Advancements in Cortisol detection: From conventional methods to next-generation technologies for enhanced hormone monitoring [J]. *ACS Sens*, 2024, 9(4): 1666-1681.
- [18] Balasamy S, Atchudan R, Arya S, *et al.* Cortisol: Biosensing and detection strategies [J]. *Clin Chim Acta*, 2024, 562: 119888.
- [19] 李小红, 付成, 付世建. 焦虑对雌性成年斑马鱼热耐受和游泳能力的影响 [J]. *水生生物学报*, 2024, 48(9): 1566-1572.
- [20] Singh D, Singh P, Srivastava P, *et al.* Development and challenges in the discovery of 5-HT(1A) and 5-HT(7) receptor ligands [J]. *Bioorg Chem*, 2023, 131: 106254.
- [21] Albert P R, Le François B, Millar A M. Transcriptional dysregulation of 5-HT1A autoreceptors in mental illness [J]. *Mol Brain*, 2011, 4: 21.
- [22] Albert P R. Transcriptional regulation of the 5-HT1A receptor: Implications for mental illness [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012, 367(1601): 2402-2415.
- [23] Popova N K, Naumenko V S. 5-HT1A receptor as a key player in the brain 5-HT system [J]. *Rev Neurosci*, 2013, 24(2): 191-204.
- [24] Terao T, Ishii N, Hirakawa H, *et al.* Is the bell-shaped dose-response curve of the selective serotonin reuptake inhibitor due to 5-HT(1A) auto-receptors? [J]. *Med Hypotheses*, 2020, 140: 109681.
- [25] Bandeira Junior G, Baldisserotto B. Fish infections associated with the genus *Aeromonas*: A review of the

- effects on oxidative status [J]. *J Appl Microbiol*, 2021, 131(3): 1083-1101.
- [26] Lemaire O N, Méjean V, Iobbi-Nivol C. The *Shewanella* genus: Ubiquitous organisms sustaining and preserving aquatic ecosystems [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2020, 44(2): 155-170.
- [27] Janda J M, Abbott S L. The genus *Shewanella*: From the briny depths below to human pathogen [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2014, 40(4): 293-312.
- [28] 郝丽华, 周秀彦. 从微生物-肠-脑轴分析焦虑、抑郁与炎症性肠病关系的进展 [J]. *中国临床研究*, 2021, 34(5): 694-698.
- [29] Jiang H Y, Zhang X, Yu Z H, *et al.* Altered gut microbiota profile in patients with generalized anxiety disorder [J]. *J Psychiatr Res*, 2018, 104: 130-136.
- [30] Ma X Y, Shin Y J, Park H S, *et al.* *Lactobacillus casei* and its supplement alleviate stress-induced depression and anxiety in mice by the regulation of BDNF expression and NF- $\kappa$ B activation [J]. *Nutrients*, 2023, 15(11): 2488.
- [31] Liu J F, Zhang T H, Wang Y Y, *et al.* Baicalin ameliorates neuropathology in repeated cerebral ischemia-reperfusion injury model mice by remodeling the gut microbiota [J]. *Aging*, 2020, 12(4): 3791-3806.
- [32] Roth W, Zadeh K, Vekariya R, *et al.* Tryptophan metabolism and gut-brain homeostasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2973.

[责任编辑 李亚楠]