

王晓宇,马富强,张晓宁,等. 不可预期应激刺激对大鼠消化道免疫和微生物菌群的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 1-9.

Wang XY, Ma FQ, Zhang XN, et al. Effects of chronic heterotypic intermittent stress stimulation on gastrointestinal immunity and microflora in rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.08.001

不可预期应激刺激对大鼠消化道免疫和 微生物菌群的影响

王晓宇¹,马富强²,张晓宁¹,何伟¹,宿杨帅¹,万红叶¹,胡玲¹,景向红^{1*}

(1.中国中医科学院针灸研究所,北京 100700; 2.洛阳市第一中医院,河南 洛阳 471000)

【摘要】 **目的** 通过对9 d不可预期应激刺激干预后大鼠的观察,分析不可预期应激刺激对胃肠道免疫系统和微生物种群的影响,为慢性应激对胃肠道功能的研究提供参考。**方法** 24只SD大鼠随机分为空白组和慢性应激模型组。模型组大鼠连续9 d接受不可预期应激刺激。造模完成后随机选择5只正常组和模型组大鼠,采集其粪便样本进行肠道微生物多样性分析。两组各12只大鼠中,随机选取4只进行灌流固定,取胃窦、结肠组织进行形态学观察;其余8只大鼠取血浆和肾上腺组织检测其中皮质酮的含量。**结果** (1)9 d不可预期应激刺激后,模型组大鼠9 d体重增值与正常组大鼠相比明显减少($P=0.001$),模型组大鼠肾上腺组织中皮质酮含量与正常组大鼠相比明显降低($P=0.006$);模型组大鼠血浆中皮质酮含量与正常组大鼠相比增加($P=0.025$)。(2)9 d后模型组大鼠的胃黏膜层上皮细胞排列较正常组稀疏,其厚度与正常组相比减少($P=0.034$);模型组大鼠的胃黏膜固有层中性粒细胞数量与正常组相比减少($P=0.016$);模型组大鼠的结肠黏膜中性粒细胞数量与正常组相比增多($P=0.013$)。3)经过9 d慢性不可预期应激,Alpha多样性分析显示,模型组大鼠粪便样本OTU中细菌种类与正常组大鼠相比明显增加($P=0.001$);其中模型组大鼠样本中脱硫弧菌科和螺杆菌科的占比为与正常组大鼠相比增加($P=0.011, P=0.047$);模型组大鼠样本中类杆菌科的占比与正常组大鼠相比明显减少,差异具有极显著的统计学意义($P=0.001$)。**结论** 9 d不可预期应激刺激可以造成一个稳定的慢性应激大鼠模型,慢性应激所导致的免疫抑制与大鼠肠道微生物菌群失调伴随发生。

【关键词】 不可预期应激;慢性刺激;皮质酮;胃黏膜;肠道微生物菌群

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)08-0001-09

Effects of chronic heterotypic intermittent stress stimulation on gastrointestinal immunity and microflora in rats

WANG Xiaoyu¹, MA Fuqiang², ZHANG Xiaoning¹, HE Wei¹, SU Yangshuai¹,
WAN Hongye¹, HU Ling¹, JING Xianghong^{1*}

(1. Institute of Acupuncture and Moxibustion CACMS, Beijing 100700, China.
2. Luoyang No.1 Hospital of TCM, Luoyang 471000)

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of chronic heterotypic intermittent stress (HIS) on the gastrointestinal immune system, particularly in terms of (1) the morphology of the gastric and colonic mucosa, and (2)

【基金项目】 国家自然科学基金(81674083)。

【作者简介】 王晓宇(1978—),女,副研究员,研究方向:针灸的效应及机制研究。E-mail: xiaorain_wang@hotmail.com

【通信作者】 景向红(1966—),女,研究员,研究方向:针灸作用机理研究。E-mail: jxhtjb@263.net

intestinal microbial diversity. **Methods** We randomly divided 24 SD rats into a control group and a model group. The rats in the model group received HIS for 9 days. After the 9 days of modeling, five rats in the control and model group were randomly selected, and fecal samples were collected for gut microbial diversity analysis. Four of the 12 rats from each of the two groups were randomly selected for perfusion and fixation, and tissues from the gastric antrum and colon were taken for morphological observation. Plasma and adrenal tissues were taken from the remaining eight rats for assessment of corticosterone content. **Results** (1) After 9 days of HIS, the rats in the model group had gained significantly less weight than those in the control group ($P=0.001$). Furthermore, the corticosterone content in adrenal tissue was significantly lower in the model group vs. the control group ($P=0.006$), and the corticosterone content in plasma was higher in the model group vs. the control group ($P=0.025$). (2) After HIS, the arrangement of gastric mucosal epithelial cells in the model group was thinner than that in the control group ($P=0.034$). Additionally, the number of neutrophils in the lamina propria of the gastric mucosa in the model group was lower than that in the control group ($P=0.016$). The number of neutrophils in the colonic mucosa in the model group was higher than that in the control group ($P=0.013$). (3) After 9 days of HIS, Alpha diversity analysis showed that the number of operational taxonomic units in the fecal samples from the model group was significantly higher than that in the control group ($P=0.001$). The proportion of desulfovibrionaceae and helicobacteraceae in the model group was higher than that in the control group ($P=0.011$, $P=0.047$). Furthermore, the proportion of bacteroidaceae in the model group was significantly lower than that in the control group ($P=0.001$). **Conclusions** Nine days of HIS induced a stable rat model of chronic stress in which chronic stress-induced immunosuppression occurred concomitantly with dysregulation of the gut microbial flora.

【Keywords】 heterotypic intermittent stress; chronic stress; corticosterone; gastric mucosa; intestinal microflora

急性的应激刺激可通过影响胃肠道血流、运动收缩功能而产生直接的作用^[1]。慢性应激刺激对胃肠道的的影响与急性应激明显不同,其所致的焦虑和紧张可增加如腹泻^[2]、便秘、胀气和腹痛^[3]等症^[4],因此较多的研究工作关注了慢性应激与功能性消化不良、肠易激综合征之间的联系^[5-6]。在慢性应激刺激对胃肠道产生影响的过程中,免疫系统^[7]和肠道微生物种群^[8]的改变也起到了重要的作用,但在目前动物实验中对这两方面内容的观察和系统研究比较少。

在研究慢性应激的动物实验中,为了避免神经内分泌系统对应激刺激的适应和习惯化,慢性应激模型的建立从单一刺激源的模式过渡到多重刺激源的模式^[9]。慢性不可预期刺激最初由 Katz 等人^[10]提出,多年来该刺激模式已经被反复的修改,并作为研究抑郁症和创伤应激障碍的一个有价值的模型系统得到研究者的重视^[11]。在大鼠慢性应激模型的建立中,较常用的方法有:束缚应激,制动应激,寒冷应激、电击、听源性应激和环境应激等^[12]。本研究中选择了避水应激,强迫游泳应激,寒冷束缚应激作为不可预期刺激的应激源,(与 1.3.1 对应)对大鼠慢进行为期 9 d 干预^[13],使用随机数列来组合排列不同刺激的顺序。通过对接受该刺激大鼠体重、胃黏膜受损情况、应激程度以及肠道微生物多样性的观察,分析慢性应激刺激对胃

肠道免疫系统和微生物种群的影响,为慢性应激对胃肠道功能的研究提供重要的补充和参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24 只 6 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体重(207.50±4.64)g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供[SCXK(京)2016-0002]。实验动物均饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所[SYXK(京)2016-0021]。适应性饲养 3 d 后,根据体重随机分为正常组和模型组,每组 12 只。模型组大鼠连续 9 d 接受不可预期应激刺激,实验内容经中国中医科学院针灸研究所伦理委员会审查(D2018-04-13-1)。

1.2 主要试剂与仪器

10%福尔马林固定液(索莱宝,中国);皮质酮(Corticosterone, Cort)荧光免疫分析试剂盒(R&D systems,美国);无水乙醇(国药集团,中国);二甲苯(国药集团,中国);苏木精(SIGMA,美国);水溶性伊红(国药集团,中国);DNA Marker(Thermo,美国);琼脂糖(Oxoid,英国);溴化乙锭(Thermo,美国);冰乙酸(国药集团,中国);异丙醇(国药集团,中国)。

电子秤(日立,日本);EG1150H 组织包埋机(徕卡,德国);RM2235 石蜡切片机(徕卡,德国);

光学显微镜(奥林巴斯,日本);Thermo 4℃低温高速离心机(Thermo,美国);全波长扫描式多功能酶标仪(Thermo,美国);T-gradient PCR 仪(Biometra,德国);Gel-Doc2000 凝胶成像系统(Bio-rad,美国);变性梯度凝胶电泳仪(Bio-rad,美国);DNA 测序仪(Hitachi,日本);凝胶电泳成像分析仪(Bio-rad,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 不可预期应激模型的建立

模型组大鼠连续 9 d 接受不可预期应激刺激。该刺激由 3 个随机选择的应激源组成:避水应激(water avoidance stress, WAS) 60 min,强迫游泳应激(forced swimming stress, FSS) 20 min,寒冷束缚应激(cold restraint stress, CRS) 5 min。每天上午 8 点到 11 点之间,模型组大鼠进行应激刺激,所使用的应激源由电脑设定随机序列来确定。避水应激刺激的实施:大鼠被放置在一个长度 8.5 cm 宽度 6 cm 高度为 12 cm 的高台上并放入一个装满水的塑料容器(长 54 cm、宽 36 cm、高 14 cm)中 60 min,实施的时间是第 1、4、6 天。强迫游泳应激刺激的实施时间是第 2、7、9 天。对于 CRS,实验动物被限制在金属固定器中,浸入 4℃的水中 5 min,实施的时间是第 3、5、8 天。正常组大鼠同时被放置到另一个不进行应激刺激的实验室。

9 d 造模完成后随机选择 5 只正常组和模型组大鼠,采集其粪便样本进行肠道微生物多样性分析。两组各 12 只大鼠中,随机选取 4 只正常组和模型组大鼠进行灌流固定,取胃窦、部结肠组织进行形态学观察;各组其余 8 只大鼠取血浆和肾上腺组织检测其中皮质酮的含量,取材完毕后将大鼠放入二氧化碳箱中处死。

1.3.2 血清及肾上腺中皮质酮含量的测量

正常组和模型组大鼠于第 9 天后上午经心脏取血浆和肾上腺组织。使用双抗夹心 ELISA 分别测定血浆及肾上腺组织中的皮质酮含量,分析结果使用酶标仪在 450 nm 吸收波长读数,使用标准品 OD 值建立标准方程,再将样本 OD 值代入标准方程求得样本含量。

1.3.3 胃组织石蜡切片的观察

随机选取 4 只正常组和模型组大鼠进行灌流固定,每只大鼠取 1.5 cm×0.5 cm 胃窦部和结肠组织,使用 4%的甲醛溶液进行固定,进行石蜡包埋、切片并进行 HE 染色,染色完成后使用中性树脂封片进

行观察。胃黏膜厚度的测量:随机选择正常组和模型组大鼠各样本中胃黏膜 2 个视野,测量每个视野下胃黏膜的厚度,取其平均值。中性粒细胞的计数:在 40 倍镜下,随机选择正常组和模型组大鼠各样本中胃黏膜及结肠 2 个视野,测量每个视野下胃黏膜固有层及结肠黏膜中的中性粒细胞个数,取其平均值。

1.3.4 胃肠道微生物多样性分析

随机选择 5 只正常组和模型组大鼠,采集其粪便进行胃肠道微生物多样性分析。提取各组样本总 DNA 后,通过热循环 PCR 系统,使用正向引物 341F-35 (5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGTAGACGTCCTAYGGGRBGCASCAG-3') 和反向引物 806R (5'-GCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGACTACNNGGTATCTAAT-3') 靶向 16S rRNA 基因的 V3~V4 区域进行扩增^[14-15]。PCR 反应一式三份,起始变性步骤是在 95℃进行 3 min,然后在 95℃进行 27 轮变性 30 s,在 55℃进行 30 s 退火,并在 72℃进行 45 s 的延伸,最后的延伸步骤为 72℃,持续 10 min。扩增的产物在 2%琼脂糖凝胶上可视化,经纯化、定量和均一化形成测序文库。

建好的文库先进行文库质检,质检合格的文库使用 Illumina HiSeq 2500 进行高通量测序。所获得的原始图像数据文件,经碱基识别(base calling)分析转化为原始测序序列(sequenced reads)。将 HiSeq 测序得到的双端序列数据使用 FLASH v1.2.7 软件拼接成一条序列 Tags,使用 Trimmomatic v0.33 软件对拼接得到的 Raw Tags 进行过滤,使用 UCHIME v4.2 软件鉴定并去除嵌合体序列,得到最终有效数据。在完成数据预处理后,对信息进行分析,划分操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)并进行多样性分析。分类分析是基于 97% 的同一性阈值获得的 OTUS,因为这个同一性值通常被认为代表物种水平。将 OTU 的代表序列与微生物参考数据库进行比对可得到每个 OTU 对应的物种分类信息,进而可在个水平(门、纲、类、科、属、种)统计各样本群落组成,生成不同分类水平上的物种丰度表。Alpha 多样性反映的是单个样品内部的物种多样性,有多种衡量指标: Ace、Chao1 等。使用 QIIME 软件对数据进行 Beta 多样性分析,比较不同组样本在物种多样性方面存在的差异大小。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理,计量资料

以平均数±标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示。符合正态分布且方差齐者,采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验;不满足方差齐性或正态分布则采用 Kruskal-Wallis H 检验,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义的标准。配对样本数据采用配对样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 不可预期应激刺激对大鼠体重的影响

9 d 不可预期应激刺激后,模型组大鼠体重均值为 (271.40 ± 4.17) g,与正常组大鼠 (300.64 ± 4.22) g 相比明显减少,差异具有极显著的统计学意义($P < 0.01$)。模型组大鼠在应激 9 d 中体重增值为 (58.58 ± 3.80) g,与正常组大鼠未受应激生长 9 d (92.54 ± 3.57) g 相比明显减少,差异具有极显著的统计学意义($P = 0.001$)。(见图 1)

2.2 不可预期应激刺激对大鼠肾上腺及血清中皮质酮含量的影响

9 d 不可预期应激刺激后,模型组大鼠肾上腺组织中皮质酮含量为 (0.20 ± 0.02) pg/mg,与正常组大鼠 (0.34 ± 0.03) pg/mg 相比明显降低,差异具有极显著的统计学意义($P = 0.006$)。模型组大鼠在应激 9 d 后血浆中皮质酮含量 (0.29 ± 0.03) pg/mL,与正常组大鼠 (0.17 ± 0.03) pg/mL 相比明显增加,差异具有显著的统计学意义($P = 0.025$)。(见图 2)

2.3 不可预期应激刺激对大鼠胃黏膜的影响

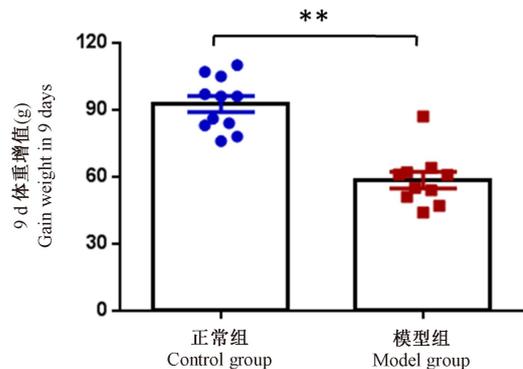
正常组大鼠的胃黏膜层上皮细胞排列整齐,黏膜肌层与黏膜下层结构清晰,固有层可见中性粒细胞。模型组大鼠的胃黏膜层上皮细胞排列较正常组稀疏,其厚度为 (635.14 ± 36.00) μm ,与正常组

(893.86 ± 45.52) μm 相比明显减少,差异具有显著的统计学意义($P = 0.034$)。模型组大鼠的胃黏膜固有层中性粒细胞数量 (16.27 ± 1.80) 个与正常组 (23.33 ± 2.80) 个相比明显减少,差异具有显著的统计学意义($P = 0.016$)。(见图 3)

正常组大鼠的结肠黏膜组织中可散见中性粒细胞。与正常组相比,模型组大鼠的结肠组织中可观察到较多数量的中性粒细胞浸润。模型组大鼠结肠黏膜中性粒细胞数量为 (34.50 ± 3.10) 个与正常组 (21.50 ± 2.60) 个相比明显减少,差异具有显著的统计学意义($P = 0.013$)。(见图 4)

2.4 不可预期应激刺激对大鼠胃肠道微生物多样性的影响

9 d 不可预期应激刺激后,取 5 只模型组大鼠和 5 只正常组大鼠粪便样本进行了微生物多样性分析。基于细菌(Silva)和真菌(UNITE)分类学数据

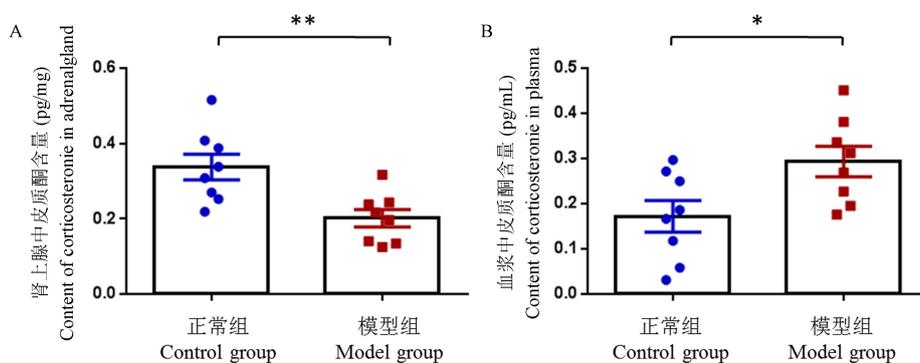


注:与正常组比较,** $P < 0.01$ 。

图 1 9 d 不可预期应激刺激对大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 12$)

Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Effect of 9 days HIS on body weight in rats

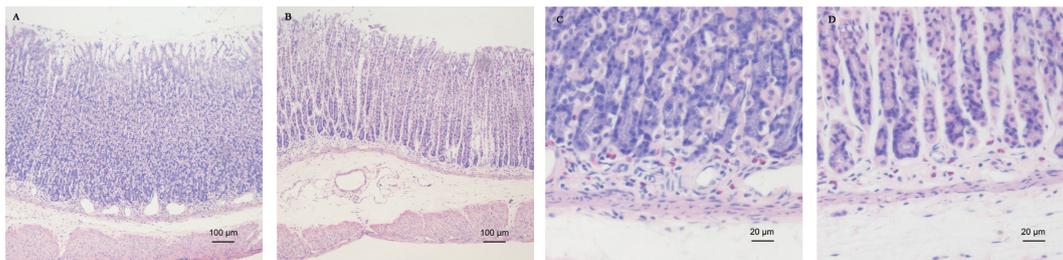


注:A:与正常组比较,** $P < 0.01$;B:与正常组比较,* $P < 0.05$ 。

图 2 9 d 不可预期应激刺激对大鼠肾上腺及血清中皮质酮含量的影响($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 8$)

Note. A, Compared with control group, ** $P < 0.01$. B, Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Effect of 9 days HIS on CORT levels in adrenal gland and plasma

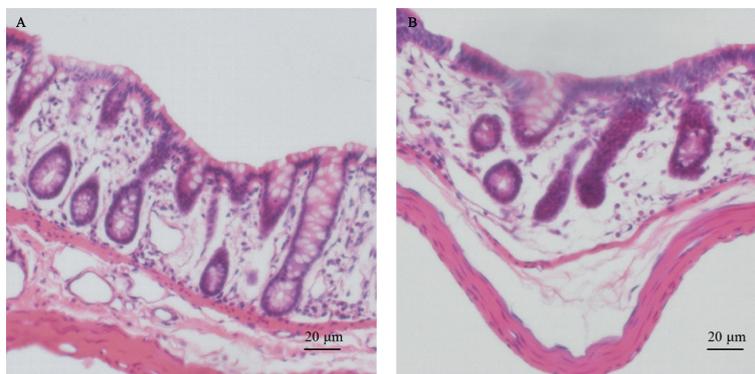


注: A: 正常组; B: 模型组; C: 正常组; D: 模型组。

图 3 9 d 不可预期应激刺激对大鼠胃黏膜的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n=4$)

Note. A, Control group. B, Model group. C, Control group. D, Model group.

Figure 3 Effect of 9 days HIS on gastric mucosa in rats



注: A: 正常组; B: 模型组。

图 4 9 d 不可预期应激刺激对大鼠结肠黏膜的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n=3$)

Note. A, Control group. B, Model group.

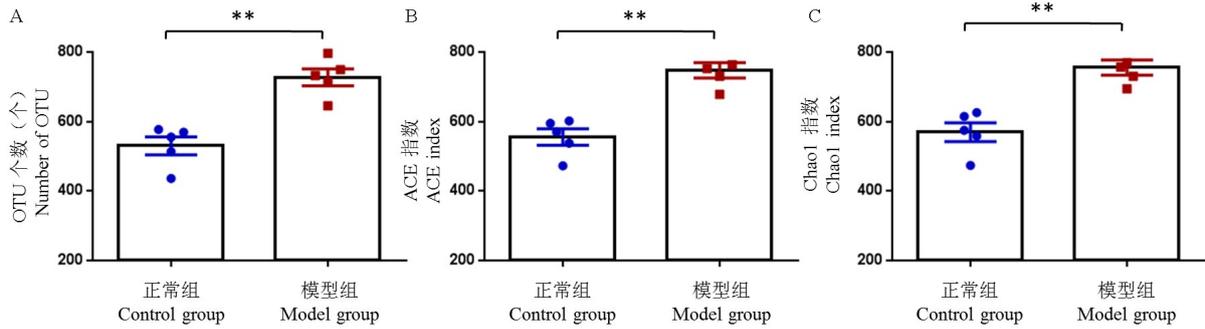
Figure 4 Effect of 9 days HIS on colonic mucosa in rats

库,对样本 OTU 聚类进行分类学注释,并通过聚类得到个样本的 OTU 聚类的个数。Alpha 多样性分析结果显示模型组大鼠样本中 OTU 个数为(727.20±24.66)个,与正常组大鼠(530.00±25.96)个相比明显增加,差异具有极显著的统计学意义($P=0.001$)。对所获得的数据进行 Alpha 多样性分析,可以观察到模型组大鼠样本 ACE 指数为(747.20±21.98),与正常组大鼠(555.34±23.47)相比明显增加,差异具有极显著的统计学意义($P=0.001$);模型组大鼠样本 Chao1 指数为(755.04±21.31),与正常组大鼠(569.40±26.94)相比明显增加,差异具有极显著的统计学意义($P=0.001$) (见图 5、6)。

正常组和模型组大鼠样本中优势菌种主要归属于拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)及变形菌门(Proteobacteria)三大类,与肠道主要固有菌群的构成相同。其中模型组大鼠样本中脱硫弧菌科(Desulfovibrionaceae)的占比为(2.53±0.46)%,与正常组大鼠(0.78±0.27)%相比

明显增加,差异具有显著的统计学意义($P=0.011$);模型组大鼠样本中螺杆菌科(Helicobacteraceae)的占比为(8.21±1.86)%,与正常组大鼠(2.90±1.29)%相比明显增加,差异具有显著的统计学意义($P=0.047$)。模型组大鼠样本中类杆菌科(Bacteroidaceae)的占比为(0.35±0.11)%,与正常组大鼠(2.60±0.44)%相比明显减少,差异具有极显著的统计学意义($P=0.001$)。(见图 7、8)

通过主成分分析(principal component analysis, PCA)的方法,对各组样本进行 Beta 多样性分析,可以观察到正常组和模型组大鼠样本中菌种主要成分有分离的趋势,两组细菌群落结构有一定的差异(图 9)。正常组大鼠中第一主成分对样品差异的贡献值为 74.38%,第二主成分对样品差异的贡献值为 11.42%。与模型组中第一主成分对样品差异的贡献值 83.19%和第二主成分对样品差异的贡献值 7.44%相比,差异无统计学意义($P=0.341$)。(见图 9)

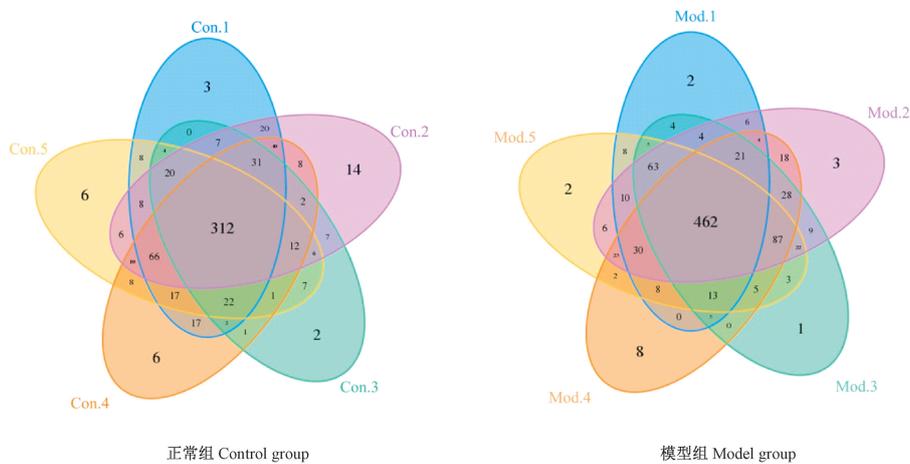


注:A:模型组与正常组比较, ** $P < 0.01$; B:模型组与正常组比较, ** $P < 0.01$; C:模型组与正常组比较, ** $P < 0.01$ 。

图5 9 d 不可预期应激刺激对大鼠胃肠道微生物多样性的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 5$)

Note. A, Model group compared with control group, ** $P < 0.01$. B, Model group compared with control group, ** $P < 0.01$. C, Model group compared with control group, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Effect of 9 Days HIS on gastrointestinal microbial diversity in rats

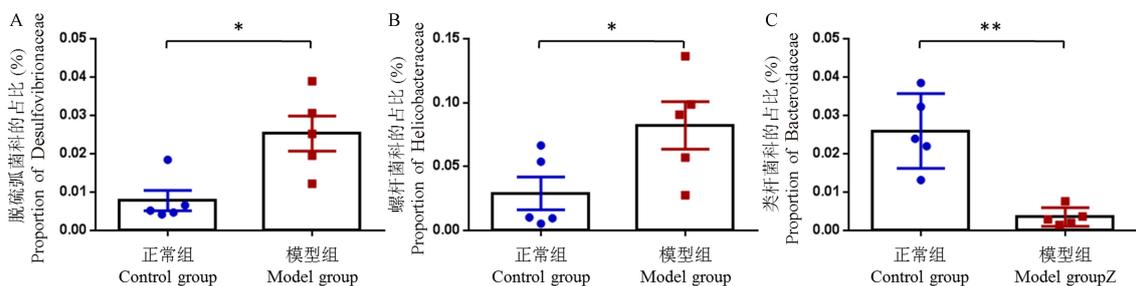


注:Venn 图可以展示样本之间共有、特有 OTU 数目,直观地表现出样本间 OTU 的重合情况。

图6 正常组和模型组各样本胃肠道微生物 OTU Venn 图

Note. The Venn diagram can show the number of unique OTUs shared between samples, visually showing the coincidence of OTUs between samples.

Figure 6 Gastrointestinal microbe OTU Venn map of control and model groups



注:A:模型组与正常组比较, * $P < 0.05$; B:模型组与正常组比较, * $P < 0.05$; C:模型组与正常组比较, ** $P < 0.01$ 。

图7 9 d 不可预期应激刺激对大鼠胃肠道细菌中脱硫弧菌科、螺杆菌科和类杆菌科占比的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 5$)

Note. A, Model group compared with control group, * $P < 0.05$. B, Model group compared with control group, * $P < 0.05$. C, Model group compared with control group, ** $P < 0.01$.

Figure 7 Effect of 9 Days HIS on proportion of desulfovibrionaceae, helicobacteraceae and bacteroidaceae in gastrointestinal microbial diversity

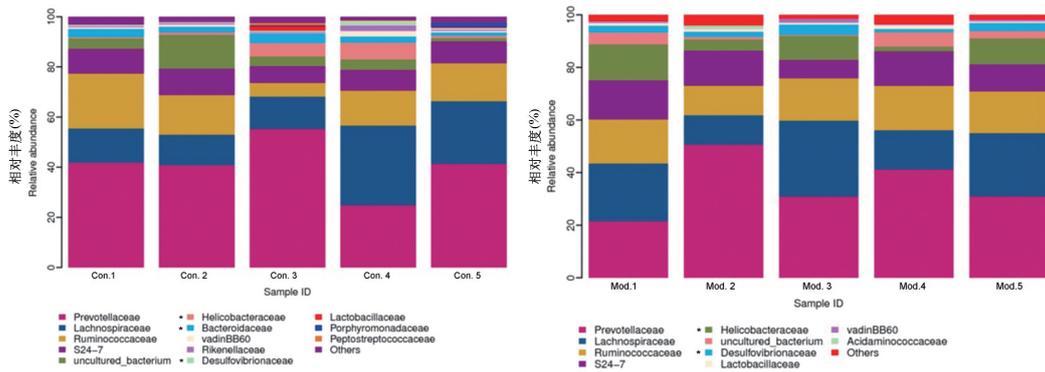


图 8 正常组和模型组各样本胃肠道细菌物种分布柱状图

Figure 8 Histogram of species distribution of gastrointestinal bacteria in control and model groups

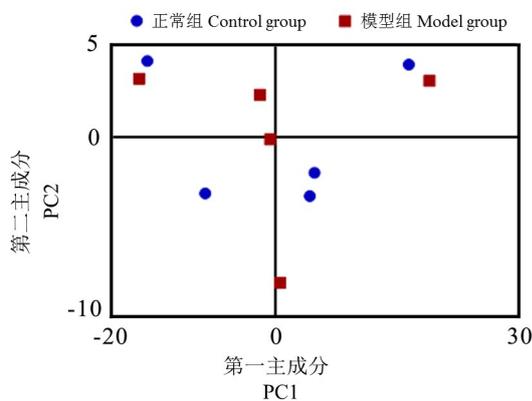


图 9 正常组和模型组各样本胃肠道细菌物种 PCA 分析图

Figure 9 PCA analysis of gastrointestinal bacteria in control and model groups

3 讨论

具有一致性和可重复性的实验模型和范式是推动生物学科发展的助力之一。在慢性应激研究中不可预期应激刺激模式可以提供更一致的造模方法并提高了在不同实验室之间产生可重复结果的可能性^[16]。本研究中采用的 9 d 不可预期应激刺激造成大鼠体重增幅明显降低^[17-18]。同时观察到慢性应激导致血浆皮质酮含量显著升高^[19]，肾上腺肥大但皮质酮含量减少的现象^[20]。说明经过 9 d 不可预期刺激后大鼠的下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 已被激活^[9]。

慢性应激刺激对胃肠道免疫功能的影响也是显而易见的。长期应激刺激可以直接影响胃窦和胃底上皮细胞的增殖^[21]，并导致血管充血以及回肠和结肠上皮的退化^[22]。有不少研究者们注意到了应激可诱导的血浆皮质酮升高通过激活糖皮质激素

受体抑制先天免疫^[23]，14 d 慢性应激暴露导致雄性 Wistar 大鼠血浆中 IgG 抗体水平和迟发型超敏反应 (DTH) 响应受到抑制^[24]。有研究观察到慢性应激对大鼠皮肤的免疫力产生了免疫抑制，抑制了白细胞从血液到皮肤的动员^[25]。这一结果与本研究中观察到慢性应激大鼠胃黏膜固有层中性粒细胞数量减少的现象类似。本研究中还观察到，慢性不可预期刺激导致结肠黏膜中性粒细胞数量高于正常组，说明慢性应激刺激与肠道慢性炎症之间的具有密切的联系。长期、持续的压力会增加溃疡性结肠炎患者复发的次数^[26]，环境应激延长了克罗恩病的病程^[27]。这与应激对神经内分泌、行为和免疫功能具有强大调节能力关系密切^[28]。还有研究观察到长期暴露于社会心理应激会促进大鼠肠黏膜炎症和肥大细胞介导的屏障功能障碍；应激引起的线粒体损伤和空肠通透性增加，与肥大细胞激活密切相关^[29]。说明肥大细胞可以作为观察慢性应激刺激对肠道免疫功能影响更精准的新靶点，这个方向的研究我们会在之后的工作中继续进行。

在过去的几年中，得益于高通量核酸检测技术的发展，对肠脑轴 (肠道和大脑之间的双向通信系统) 的研究大量增加^[30]，肠道菌群作为研究的关键角色得到了更多关注。应激所致的免疫抑制是影响肠道微生物种群变化的原因之一^[31]，在本研究中我们观察到 9 d 不可预期应激刺激后，模型组大鼠粪便样本中微生物种类的明显增多。其中模型组大鼠样本中脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae) 和螺杆菌科 (Helicobacteraceae) 细菌的占比较正常对照组明显增加，而类杆菌科 (Bacteroidaceae) 细菌的占明显下降。有研究使用牛蔗糖喂养的大鼠导致其发

生肠道营养不良,这类大鼠的结肠微生物菌群观察中同样显示出脱硫弧菌科的细菌丰度的增加^[32];在调查上海市实验动物生产设施以及大鼠、小鼠细菌携带状况的研究中,观察到所有清洁级设施均存在螺杆菌和牛棒状杆菌污染^[33]。在大肠癌患者的早期诊断和筛查中,有研究观察到双歧杆菌和乳杆菌明显少于正常健康组,尤其是膜菌群的肠杆菌、肠球菌、类杆菌、双歧杆菌和乳杆菌的占比与正常组对比明显下降^[34]。说明慢性应激造成大鼠肠道微生物菌群失调,具体表现为正常健康者携带的有益菌占比下降,而与肠道营养不良,设施污染相关的菌群占比上升。本研究中,由于采集的样本量偏少,在 Beta 多样性分析过程中,未发现两组大鼠第一和第二主成分对样品差异的贡献值有差异,仅可观察到正常组和模型组大鼠样本中菌种主要成分有分离的趋势,在下一步的研究中,会加大样本量继续进行观察。综上所述,9 d 不可预期应激刺激可以造成一个稳定的慢性应激大鼠模型。在这个模型中本研究通过对大鼠体重、胃黏膜结肠黏膜形态学以及肠道微生物多样性的观察,全面的分析了慢性应激刺激对胃肠道免疫系统和微生物种群的影响,为慢性应激对胃肠道功能的研究提供重要的补充和参考。

参考文献:

- [1] Stam R, Akkermans LM, Wiegant VM. Trauma and the gut: interactions between stressful experience and intestinal function [J]. *Gut*, 1997, 40(6): 704-709.
- [2] 马晓玲,夏提古丽·阿不利孜,石磊岭,等.慢性束缚应激联合特殊饮食制备腹泻性肠易激综合征(IBS-D)大鼠模型的研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7): 12-17.
- [3] Winston JH, Xu GY, Sarna SK. Adrenergic stimulation mediates visceral hypersensitivity to colorectal distension following heterotypic chronic stress [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(1): 294-304.
- [4] O' Malley D, Quigley EM, Dinan TG, et al. Do interactions between stress and immune responses lead to symptom exacerbations in irritable bowel syndrome [J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(7): 1333-1341.
- [5] Chang L. The role of stress on physiologic responses and clinical symptoms in irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(3): 761-765.
- [6] Bennett EJ, Piesse C, Palmer K, et al. Functional gastrointestinal disorders: psychological, social, and somatic features [J]. *Gut*, 1998, 42(3): 414-420.
- [7] Hart A, Kamm MA. Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002, 16(12): 2017-2028.
- [8] Slyepchenko A, Maes M, Jacka FN, et al. Gut Microbiota, Bacterial translocation, and interactions with diet: pathophysiological links between major depressive disorder and non-communicable medical comorbidities [J]. *Psychother Psychosom*, 2017, 86(1): 31-46.
- [9] Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents [J]. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1998, 10(2): 230-231.
- [10] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247-251.
- [11] Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Choi DC, et al. Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(4): 2008-2017.
- [12] McCarty R. Optimizing laboratory animal stress paradigms: The H-H* experimental design [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2017, 75: 5-14.
- [13] Zhou YY, Wanner NJ, Xiao Y, et al. Electroacupuncture alleviates stress-induced visceral hypersensitivity through an opioid system in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(48): 7201-7211.
- [14] Zakrzewski M, Goesmann A, Jaenicke S, et al. Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing [J]. *J Biotechnol*, 2012, 158(4): 248-258.
- [15] Niem JM, Billones-Baaijens R, Stodart B, et al. Diversity profiling of grapevine microbial endosphere and antagonistic potential of endophytic pseudomonas against grapevine trunk diseases [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 477.
- [16] 樊江波, 畅洪昇, 董世芬, 等.慢性应激致肠易激综合征大鼠模型的建立与评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(2): 91-95, 88.
- [17] Ricart-Jané D, Rodríguez-Sureda V, Benavides A, et al. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat [J]. *Metabolism*, 2002, 51(7): 925-931.
- [18] 周晨, 胡浪, 李天雪, 等.应激所致肠功能紊乱大鼠模型的建立及内源性标志物的评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(6): 13-17, 2.
- [19] Du Ruisseau P, Taché Y, Selye H, et al. Effects of chronic stress on pituitary hormone release induced by combined hemiextirpation of the thyroid, adrenal and ovary in rats [J].

- Neuroendocrinology, 1977, 24(3-4): 169-182.
- [20] Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, et al. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 291(5): E965-E973.
- [21] Kuwayama H, Eastwood GL. Effects of water immersion restraint stress and chronic indomethacin ingestion on gastric antral and fundic epithelial proliferation [J]. *Gastroenterology*, 1985, 88(1 Pt 2): 362-365.
- [22] Ercan F, Cetinel S, Contuk G, et al. Role of melatonin in reducing water avoidance stress-induced degeneration of the gastrointestinal mucosa [J]. *J Pineal Res*, 2004, 37(2): 113-121.
- [23] Gao S, Deviche PJ. Glucocorticoid receptor selectively mediates stress-induced suppression of innate immunity in the House Sparrow, *Passer domesticus* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2018, 84: 427-435.
- [24] Thakur T, Gulati K, Rai N, et al. Experimental studies on possible regulatory role of nitric oxide on the differential effects of chronic predictable and unpredictable stress on adaptive immune responses [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50: 236-242.
- [25] Dhabhar FS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 917: 876-893.
- [26] Levenstein S, Prantera C, Varvo V, et al. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission [J]. *Am J Gastroenterol*, 2000, 95(5): 1213-1220.
- [27] Ringel Y, Drossman DA. Psychosocial aspects of Crohn's disease [J]. *Surg Clin North Am*, 2001, 81(1): 231-252.
- [28] Zhang J, Huang J, Aximujiang K, et al. Thyroid dysfunction, neurological disorder and immunosuppression as the consequences of long-term combined stress [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4552.
- [29] Vicario M, Guilarte M, Alonso C, et al. Chronological assessment of mast cell-mediated gut dysfunction and mucosal inflammation in a rat model of chronic psychosocial stress [J]. *Brain Behav Immun*, 2010, 24(7): 1166-1175.
- [30] Weltens N, Iven J, Van Oudenhove L, et al. The gut-brain axis in health neuroscience: implications for functional gastrointestinal disorders and appetite regulation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2018, 1428(1): 129-150.
- [31] Dantzer R, Cohen S, Russo SJ, et al. Resilience and immunity [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 74: 28-42.
- [32] Van Hecke T, De Vrieze J, Boon N, et al. Combined consumption of beef-based cooked mince and sucrose stimulates oxidative stress, cardiac hypertrophy, and colonic outgrowth of desulfovibrionaceae in rats [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(2): e1800962.
- [33] 冯洁, 谢建云, 魏晓锋, 等. 实验大鼠和小鼠多种细菌 PCR 检测与分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(10): 89-93, 116.
- [34] 李冰, 马丰玲. 肠道膜菌群检测在大肠癌早期诊断筛查中的应用分析 [J]. *中国继续医学教育*, 2016, 8(35): 48-49.

[收稿日期]2019-10-09