

徐小英,胡慧美,尹秋雄,等. 水浸束缚应激模型在小鼠结肠损伤研究中的探索与实践 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(4): 492-500.

Xu XY, Hu HM, Yin QX, et al. Exploration and application of water immersion restraint stress model in the study of colonic injury in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(4): 492-500.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.04.009

水浸束缚应激模型在小鼠结肠损伤研究中的探索与实践

徐小英,胡慧美,尹秋雄,曾海舟,江禹鹏,李博艺,钱国强*

(广东药科大学中医学院,广州 510006)

【摘要】 目的 探索不同造模时间对水浸束缚应激(water immersion restraint stress, WIRS)模型小鼠结肠损伤程度的影响,对比研究病理损伤程度和肠道菌群构成。**方法** 本研究共用34只KM小鼠,首先将18只小鼠随机分为对照组和WIRS4 h、12 h、24 h、36 h、48 h组,造模结束后,通过HE染色观察不同造模时间的结肠损伤程度。评估出较优的造模时间后,将16只小鼠随机分为对照组和WIRS24 h组,使用ELISA法检测结肠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)含量,使用16S rRNA测序检测结肠内容物的菌群组成改变。**结果** WIRS各组结肠腔均出现不同程度弥漫性充血和泛红,HE染色显示WIRS小鼠出现炎症细胞浸润等病理改变。WIRS24 h组损伤较明显,与WIRS36 h、48 h组相比小鼠成活率高,TNF- α 、IL-6、IFN- γ 水平均显著升高($P < 0.0001$)。与对照组相比,WIRS24 h组小鼠结肠菌群失调,弯曲杆菌门、脱铁杆菌门丰度显著增加($P < 0.01$),而脱硫杆菌门、放线菌门丰度明显减少($P < 0.05$);幽门螺杆菌属、拟杆菌属、罗氏菌属、*norank_f__Ruminococcaceae*、*unclassified_f__Oscillospiraceae*等丰度显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而*norank_f__norank_o__Clostridia_UCG-014*、脱硫弧菌属、内脏臭杆菌属等丰度显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** WIRS模型会导致小鼠结肠组织病理损伤,并且出现明显的肠道菌群组成改变。

【关键词】 水浸束缚应激;肠道菌群;病理组织损伤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 04-0492-09

Exploration and application of water immersion restraint stress model in the study of colonic injury in mice

XU Xiaoying, HU Huimei, YIN Qiuxiong, ZENG Haizhou, JIANG Yupeng, LI Boyi, QIAN Guoqiang*

(School of Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Corresponding author: QIAN Guoqiang. E-mail: tgqqian@gdpu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of various modeling times on the degree of colonic injury in mice subjected to water immersion restraint stress (WIRS) and compare the degree of inflammatory injury and the composition of intestinal flora between WIRS and control mice. **Methods** Thirty-four Kunming mice were used in this study. Eighteen mice were randomized into control, WIRS4 h, 12 h, 24 h, 36 h, and 48 h groups. After modeling, HE staining was performed to observe the degree of colonic injury at various modeling times and evaluate the modeling conditions. Sixteen mice were randomized into control and WIRS24 h groups. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and

【基金项目】广东省中医药局科研课题面上项目(20231208),广东省医学科研基金(B2021324)。

Funded by the General Scientific Research Projects of Guangdong Provincial Bureau of Traditional Chinese Medicine (20231208), Guangdong Provincial Medical Research Fund (B2021324).

【作者简介】徐小英(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治脾胃病。Email: xxyeve@163.com

【通信作者】钱国强(1982—),男,副教授,硕士生导师,医学博士,研究方向:中西医结合脾胃病基础与临床。Email: tgqqian@gdpu.edu.cn

interferon- γ (IFN- γ) contents were measured by enzyme-linked immunosorbent assays at the end of modeling. The composition of colonic contents was assessed by 16S rRNA gene sequencing. **Results** All WIRS groups exhibited various degrees of diffuse bleeding and reddening in the colonic lumen. HE staining showed inflammatory cell infiltration in WIRS mice. Colonic injury of the WIRS24 h group was obvious and the survival rate was high. TNF- α , IL-6, and IFN- γ levels were significantly increased in the WIRS24 h group ($P < 0.0001$). 16S rRNA sequencing showed intestinal flora disorder in the WIRS24 h group. Compared with the control group, the abundance of *Campylobacter*, *Deferribacterota*, *Helicobacter*, *Bacteroides*, *Roseburia*, *norank_f_Ruminococcaceae*, and *unclassified_f_Oscillospiraceae* was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and that of *Actinobacteriota*, *Desulfobacterota*, *norank_f_norank_o_Clostridia_UCG-014*, and *Odoribacter* was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** The WIRS model causes histopathological damage to the colon in mice and significant alterations in the composition of intestinal flora.

【Keywords】 water immersion restraint stress; intestinal flora; pathological tissue damage

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

精神心理、社会、环境等因素与消化系统疾病的发生、发展、防治及预后密切相关^[1]。任何引起生物反应的内在或外在刺激都被称为压力。压力会对身体施加各种作用,从体内平衡的改变到危及生命的影响和死亡^[2]。WIRS 模型是一个多重压力模型,整合了恐惧、愤怒、焦虑和绝望等心理因素和饥饿、挣扎和冷水等生理因素^[3-4],已被广泛用于研究应激性胃黏膜损伤^[5-6]、小肠损伤^[7]、勃起功能障碍^[8]、记忆缺陷^[9]等实验模型。水浸束缚应激模型通过改变肠上皮通透性诱导炎症,也用于研究临时型功能性消化不良^[10]。已有研究发现,急性 WIRS ($10 \pm 1^\circ\text{C}$, 1 h) 小鼠肠道 TNF- α 水平显著升高^[7];慢性 WIRS ($21 \pm 2^\circ\text{C}$, 4 h, 14 d) 小鼠血清 IFN- γ 水平显著升高^[11];敲除 IL-6 基因的小鼠可减轻 WIRS 引起的肠上皮损伤和细胞凋亡^[12]。肠道功能和微生物群可受到压力的影响,急性、慢性 WIRS 模型均出现了小鼠肠道菌群改变^[7,11]。本实验建立水浸束缚应激小鼠结肠损伤模型,通过对不同造模时间的小鼠结肠组织病理学观察,确定该模型相对较优造模时间,并对 WIRS24 h 组小鼠的结肠炎症因子水平及肠道微生物多样性进行观察,分析应激刺激对胃肠道免疫系统和肠道微生物种群的影响,为应激对肠道功能的研究提供重要补充和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 ~ 8 周龄实验动物 SPF 级雄性健康 KM 小鼠 34 只,体重 18 ~ 22 g,购自南方医科大学实验动物管理中心【SCXK(粤)2021-0041】。造模前适应性喂养 1 周,室温 22 ~ 23 $^\circ\text{C}$ 、光暗每日各半和湿度

60% $\pm$ 10%,并提供水和食物,饲养于广东药科大学实验动物中心屏障环境【SYXK(粤)2017-0125】。本研究经广东药科大学动物实验伦理委员会批准(gdpulac2022116)。

1.1.2 主要试剂与仪器

酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、TNF- α (INS4040301)、IL-6 (INS4010603)、IFN- γ (INS4030303) 均购买于湖北黄石艾恩斯生物技术有限公司。PowerSoilDNA 提取盒(Qbiogene 公司,美国);AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(Axygen 公司,美国);TruSeq™ DNA 样品制备试剂盒(Illumina 公司,美国)。切片机(莱卡,上海)、CX22 光学显微镜(莱卡,日本)、DM1000 徕卡显微成像系统、PCR 仪(9700 型,应用生物系统公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 分组及实验干预

(1)构建 WIRS 模型,观察不同造模时间结肠损伤程度:适应性喂养 1 周后,将 18 只 KM 小鼠随机分为对照组(Control group)和水浸束缚应激(WIRS)4 h、12 h、24 h、36 h、48 h 组,每组各 3 只小鼠。禁食 12 h 后,将各 WIRS 组小鼠束缚在铁丝网上限制活动,并且除小鼠头部外将其整个身体浸泡在($21 \pm 2^\circ\text{C}$)的水中,水位保持在小鼠的胸骨剑突水平^[4],造模时间分别为 4 h、12 h、24 h、36 h、48 h,评估出较优的造模时长。

(2)构建 WIRS 模型,观察 WIRS24 h 组小鼠的炎症因子水平和肠道菌群变化:适应性喂养 1 周后,将 16 只小鼠随机分为对照组和 WIRS24 h 组,每组各 8 只小鼠。造模方法同上,造模时间 24 h。

1.2.2 样本采集

造模结束后,采用颈椎脱位法处死小鼠,剪取

小鼠肛门上 1 cm 到盲肠端的结肠组织,收集粪便和结肠内容物,用于 16S rRNA 检测。生理盐水冲洗肠壁,结肠组织一部分立即浸入液氮中 1 min,并在 -80°C 下储存,以备后续实验;一部分在 4% 多聚甲醛中固定。

1.2.3 组织病理学观察

取材后对结肠组织进行拍照,然后分别剪取 1 cm 的组织在 4% 多聚甲醛中固定 24 h,石蜡包埋,切成 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的切片,并用苏木精-伊红(HE)染色进行组织病理学检查。

1.2.4 ELISA 检测炎症因子含量

取 -80°C 冰箱中的结肠组织,称重,匀浆。收集上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测小鼠结肠组织中 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 的含量。

1.2.5 16S rRNA 肠道菌群测序

收集粪便和盲肠内容物样品后,立即在 -80°C 下冷冻以进行下一步分析。从样本中抽提基因组 DNA,进行 16S rRNA V3 ~ V4 区域的 DNA 焦磷酸测序。将 PCR 产物纯化并均一化至等浓度。然后将产品进行 PE 文库构建和在 Illumina MiSeq 平台(美国 Illumina)上进行测序。Miseq 测序得到的 PE reads 首先根据 overlap 关系进行拼接,同时对序列质量进行质控和过滤,区分样本后进行 OTU 聚类分析。利用软件平台 Uparse(version 7.0.1090 <http://drive5.com/uparse/>)按照 97% 相似性对非重复序列(不含单序列)进行 OTU 聚类,在聚类过程中去除嵌合体,得到 OTU 的代表序列采用 RDP Classifier(version 2.11 <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>)对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析。

1.3 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 8 统计软件进行分析,以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用独立样本 t 检验分析两组之间炎症因子水平的差异,Wilcoxon 秩和检验用于检查两组之间细菌组成的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同造模时间 WIRS 小鼠的情况

WIRS4 h、12 h、24 h 组小鼠均在造模结束后处死,而 WIRS36 h 组小鼠,1 只小鼠在造模 30 h 死亡,2 只在造模 36 h 处死;WIRS48 h 组 3 只小鼠,分别在 41 h、43 h 死亡。

2.2 WIRS 小鼠的结肠组织病理学观察

如图 1A 所示,通过肉眼观察各组小鼠的结肠组织,发现对照组可见清晰毛细血管,无充血及泛红;而 WIRS 各模型组均出现不同程度结肠腔表面弥漫性充血及泛红,并且 WIRS24 h、36 h、41 h、43 h 组均有明显的充血及泛红。

HE 染色结果如图 1B 所示,对照组小鼠结肠黏膜层、黏膜下层、固有肌层、浆膜层各层界限清晰,无水肿及充血,黏膜上皮细胞排列整齐,表面光滑,肠腺规则,无炎性细胞浸润形成;WIRS4 h 组与 WIRS12 h 组,隐窝表面轻度不规则,黏膜层有极少量炎症细胞浸润,黏膜下层未见水肿;而 WIRS24 h 组小鼠结肠黏膜上皮局部缺失,皱缩脱落,腺体结构紊乱,杯状细胞减少,黏膜层内炎性细胞浸润。WIRS30 h 组也有少量炎症细胞浸润。WIRS36 h、41 h、43 h 组,肠腺、杯状细胞明显萎缩、减少,出现炎症细胞浸润较严重。结合 HE 染色切片结果,以及小鼠在造模应激时的死亡情况,得出 WIRS24 h 为相对较优的造模时间,此时结肠损伤较重,但小鼠的造模后成活率高。

2.3 WIRS24 h 组小鼠结肠组织中的 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 含量

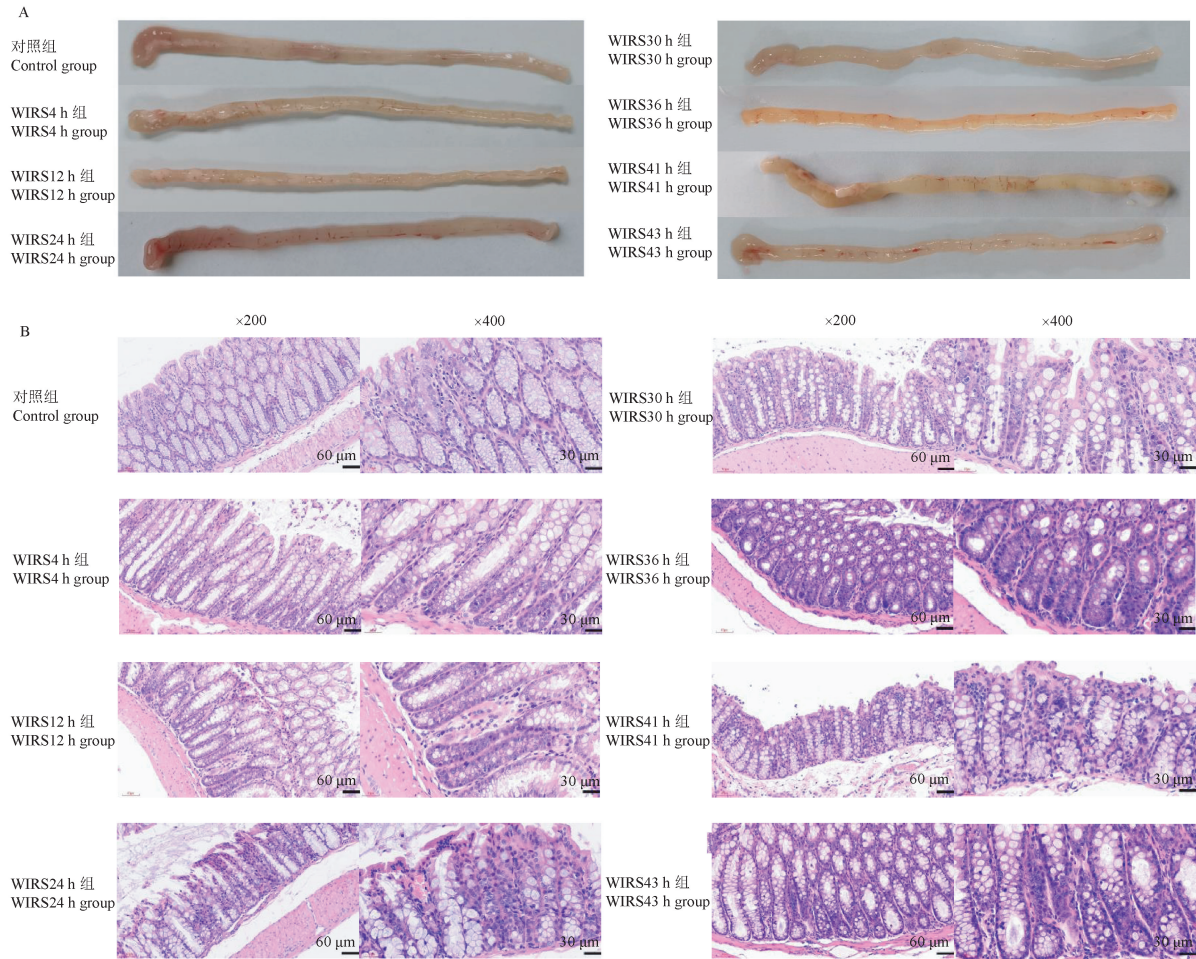
与对照组相比,WIRS24 h 组结肠组织 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 水平均显著升高($P < 0.0001$),提示 WIRS 可对小鼠结肠组织造成明显的炎症反应(见图 2)。

2.4 WIRS24 h 组小鼠肠道菌群的改变

2.4.1 稀释曲线和 α 多样性分析

稀释曲线主要反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性。随着测序数量的增加,两组稀释曲线逐渐平缓进入平台期,说明本次测序样本中细菌的丰富度与多样性均较高,所得数据量满足测序要求(见图 3)。

细菌多样性主要采用基于 OTU 聚类结果进行 α 多样性,包括 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao 指数及 Coverage 指数等。两组 Coverage 指数(0.9970 ± 0.0004 vs 0.9970 ± 0.0005)均接近 1,表明测序深度已经基本涵盖到样品中所有物种。但两组 Shannon 指数(4.500 ± 0.210 vs 4.500 ± 0.250)、Simpson 指数(0.030 ± 0.010 vs 0.026 ± 0.007)、Chao 指数(537.210 ± 66.680 vs 546.790 ± 92.920)无明显差异($P > 0.05$),说明 WIRS24 h 组小鼠与对照组小鼠的菌群多样性无显著差异。

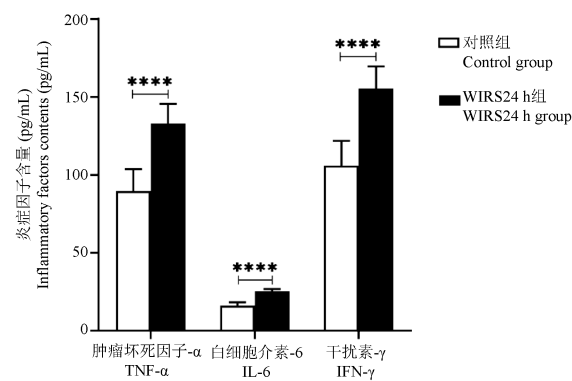


注:A:各组小鼠结肠组织肉眼观察;B:各组小鼠结肠病理形态学变化。

图1 各组小鼠的结肠组织病理学观察

Note. A. The colon of each group was observed by the naked eye. B. Pathological changes of colon in each group.

Figure 1 Histopathological observation of the colon in each group



注:与对照组比较,**** $P < 0.0001$ 。

图2 两组小鼠结肠组织中的 TNF-α、IL-6、IFN-γ 含量

Note. Compared with the control group, **** $P < 0.0001$.

Figure 2 TNF-α, IL-6 and IFN-γ contents in the colonic tissue of two groups of mice

2.4.2 小鼠肠道菌群 β 多样性分析

β 多样性分析可比较不同样本肠道菌群的物种

多样性,探索各组菌群组成的差异性。树状聚类图分析显示对照组小鼠与 WIRS24 h 组小鼠群落区分明显(见图 4)。主坐标分析(principal coordinates analysis,PCoA)与非量度多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling,NMDS)所显示,两组样本组内样本点相对聚集,而组间相对离散,说明对照组与 WIRS24 h 组组间样本具有物种差异。NMDS 结果的肺强系数(Stress)为 0.129,<0.2,表明 NMDS 分析的结果可靠。

2.4.3 小鼠肠道菌群物种组成分析

在门水平上,厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)为优势物种,比例占 80%以上(见图 5A)。与对照组相比,WIRS24 h 组小鼠弯曲杆菌门、脱铁杆菌门丰度显著增加($P < 0.01$),而脱硫杆菌门、放线菌门丰度明显减少($P < 0.05$)(见表 1)。

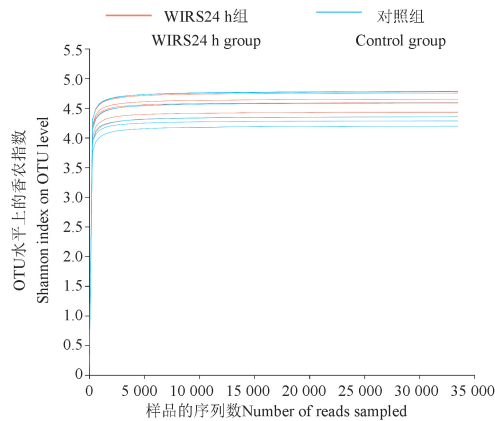
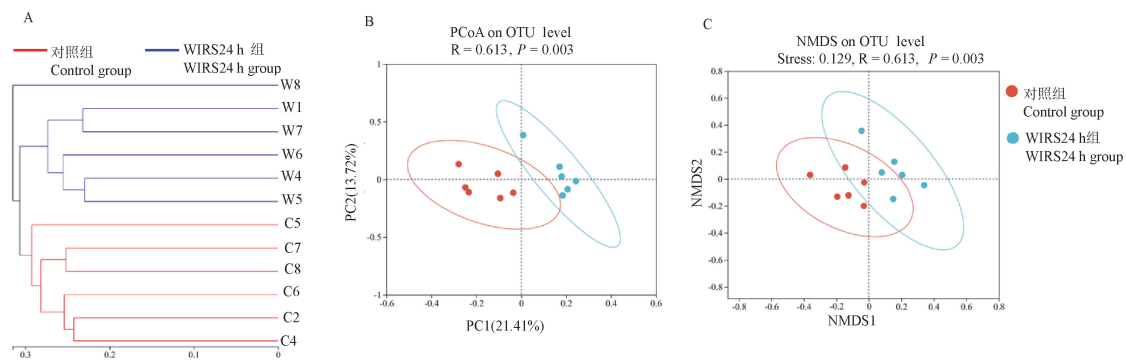


图3 样本稀释曲线

Figure 3 Sample rarefaction curve



注: A: 树状聚类分析; B: PCoA 分析; C: NMDS 分析。

图4 肠道菌群多样性分析

Note. A. Dendrogram analysis. B. PCoA analysis. C. NMDS analysis.

Figure 4 Diversity analysis of intestinal flora

表1 两组小鼠在门水平上物种相对丰度及差异分析($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Analysis of relative abundance of species and differences between the two groups of mice at the phylum level ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

菌(门) Bacteria (phylum)	物种丰度 Abundance of species		P
	对照组 (%) Control group (%)	WIRS24 h 组 (%) WIRS24 h group (%)	
弯曲杆菌 <i>Campilobacterota</i>	1.70 ± 1.45	11.02 ± 8.13	0.008**
脱硫杆菌 <i>Desulfobacterota</i>	2.08 ± 1.24	0.80 ± 0.44	0.031*
放线菌 <i>Actinobacteriota</i>	1.07 ± 1.21	0.31 ± 0.25	0.031*
脱铁杆菌 <i>Deferribacterota</i>	0.06 ± 0.08	0.26 ± 0.17	0.020*

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

2.4.4 线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe)

LEfSe 不仅可以对所有分类水平同时进行差异

在属水平上,小鼠肠道优势菌群为 *norank_f__Muribaculaceae*、*unclassified_f__Lachnospiraceae*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*norank_f__Lachnospiraceae*、幽门螺杆菌属 (*Helicobacter*)、另枝菌属 (*Alistipes*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 等 (见图 5B)。与对照组相比, WIRS24 h 组幽门螺杆菌属、拟杆菌属、罗氏菌属、*norank_f__Ruminococcaceae*、*unclassified_f__Oscillospiraceae* 等相对丰度显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而 *norank_f__norank_o__Clostridia_UCG-014*、脱硫弧菌属、内脏臭气杆菌属等相对丰度显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (表 2)。

分析,还能寻找分组之间稳健的标志物种。LEfSe 结果表明,正常组对群落结构影响较大的物种有 *f__norank_o__Clostridia_UCG-014*、*o__Clostridia_UCG-014*、*g__norank_f__norank_o__Clostridia_UCG-014*、脱硫弧菌纲 (*c__Desulfovibrionia*)、脱硫弧菌门 (*p__Desulfobacterota*) 等。WIRS24 h 组对群落结构影响较大的物种有幽门螺杆菌科 (*f__Helicobacteraceae*)、弯曲杆菌目 (*o__Campylobacterales*)、弯曲杆菌纲 (*c__Campylobacterota*)、幽门螺杆菌属 (*g__Helicobacter*)、弯曲杆菌门 (*p__Campilobacterota*)、拟杆菌属 (*g__Bacteroides*) 等 (见图 6)。

3 讨论

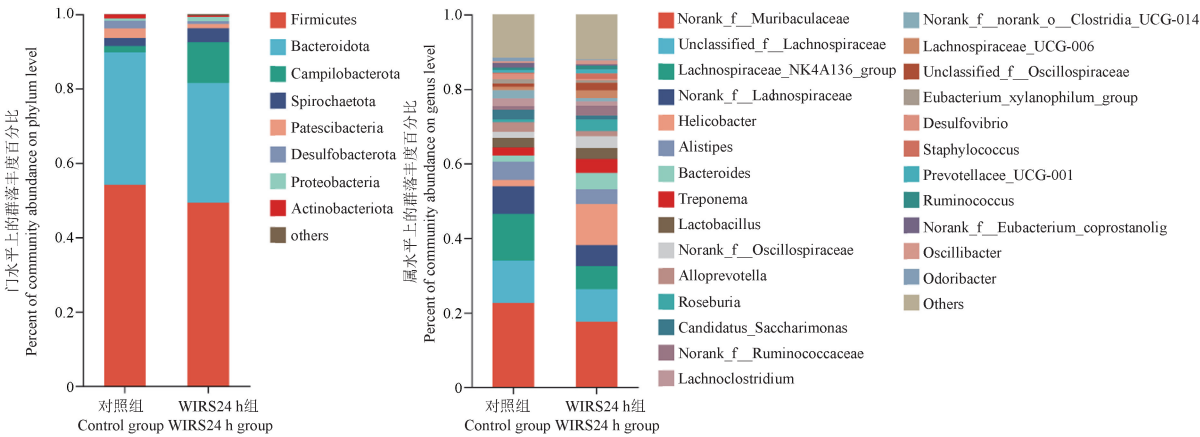
随着社会竞争日益激烈,人们生活压力越来越大,因此社会和心理因素的相互作用对胃肠道疾病发病影响日益增长,消化系统心身疾病发病率居内科心身疾病首位,近年来发病率逐渐上升^[13]。压力所产生的应激这一有害刺激会引起体内平衡紊乱

表 2 两组小鼠在属水平上物种相对丰度及差异分析($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Analysis of the relative abundance of species and differences between the two groups of mice at the genus level($\bar{x} \pm s, n = 6$)

菌(属) Bacteria (genus)	物种丰度 Abundance of species		P
	对照组 (%) Control group (%)	WIRS24 h 组 (%) WIRS24 h group (%)	
幽门螺杆菌 <i>Helicobacter</i>	1.70 ± 1.45	11.02 ± 8.13	0.008 **
拟杆菌 <i>Bacteroides</i>	1.67 ± 0.82	4.38 ± 3.09	0.031 *
罗氏菌 <i>Roseburia</i>	0.77 ± 0.45	2.58 ± 1.35	0.005 **
未排位瘤胃菌 <i>norank_f_Ruminococcaceae</i>	0.94 ± 0.51	2.66 ± 2.46	0.045 *
未排位梭菌属 <i>UCG-014 norank_f_norank_o_Clostridia_UCG-014</i>	2.25 ± 1.24	0.89 ± 0.97	0.045 *
未排位颤螺旋菌 <i>unclassified_f_Oscillospiraceae</i>	0.89 ± 1.34	2.00 ± 1.24	0.045 *
脱硫弧菌 <i>Desulfovibrio</i>	1.38 ± 0.67	0.43 ± 0.27	0.020 *
内脏臭气杆菌 <i>Odoribacter</i>	1.04 ± 0.77	0.28 ± 0.21	0.031 *

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

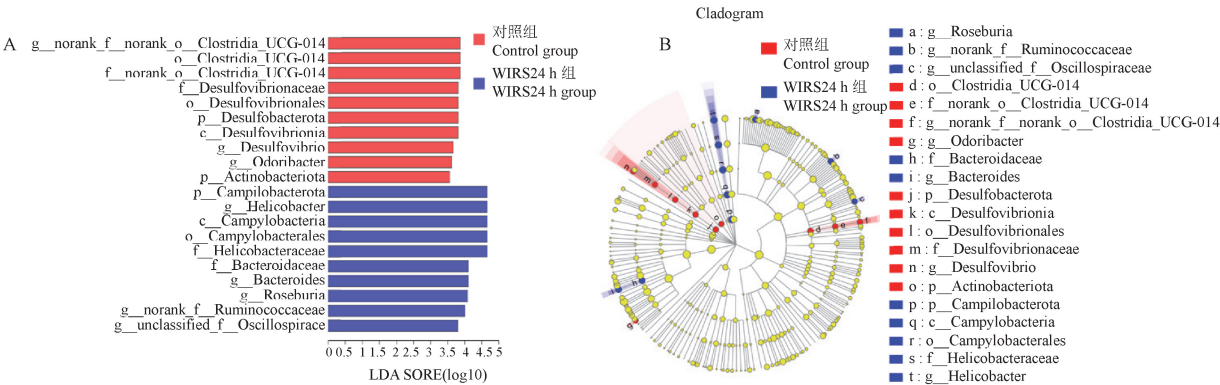


注:A:两组小鼠门水平上的群落丰度百分比;B:两组小鼠属水平上的群落丰度百分比。

图 5 在门和属水平上的两组小鼠肠道菌群结构组成的差异

Note. A. Percent of community abundance on phylum level, B. Percent of community abundance on genus level.

Figure 5 Differences in the structural composition of intestinal flora of two groups of mice at the phylum and genus levels



注:A:两组小鼠的 LDA 得分直方图, LDA 阈值 > 3.5; B:用分支图表示两组小鼠之间的显著差异;从内到外的彩色节点代表从门到属的分类单元。

图 6 LEfSe 识别潜在的生物标志物

Note. A. Histogram of LDA scores of two groups of mice with LDA threshold > 3.5. B. Branching plots were used to indicate significant differences between two groups of mice. The colored nodes from inside to outside represent the taxonomic units from phylum to genus.

Figure 6 LEfSe to identify potential biomarkers

状态,而胃肠道是对应激做出反应的主要器官^[4],严重应激对胃肠道分泌、胃肠运动、肠上皮通透性、内脏敏感性、微生物群和炎症产生很大的不良影响,可能会导致与压力相关的功能性胃肠道疾病,如肠易激综合征和消化性溃疡^[2-3]。WIRS 模型已被广泛用作应激性胃黏膜损伤模型,有研究表明在 2 ~ 14 h 的水浸束缚应激期间,胃溃疡损伤逐渐增多^[14]。急性 WIRS 减少小鼠近端和远端结肠收缩^[15],通过抑制 5-HT₃ 受体介导的生长抑素依赖性分泌抑制途径可诱导 WIRS 大鼠结肠分泌增加^[16]。WIRS 可加重溃疡性结肠炎小鼠模型的结肠黏膜损伤并改变免疫反应^[17],但目前对于 WIRS 模型的结肠组织病理学损伤研究尚不多见。本实验分别进行不同时间 WIRS 造模,发现与对照组相比,各 WIRS 模型组结肠组织均有不同程度的表面弥漫性充血及泛红,并且 HE 染色显示 WIRS24 h 组炎症细胞浸润明显,且小鼠成活率较高,故此造模时间 24 h 可能为较优的造模时间。TNF- α 、IL-6、IFN- γ 等炎症因子在结肠炎症发病过程中起重要作用^[18],本实验 WIRS24 h 组结肠组织的 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 水平较对照组显著升高,结肠组织炎症明显。上述实验结果表明,WIRS 会导致小鼠结肠明显病理损伤。

肠道细菌的总数是人体细胞总数的 10 倍以上,肠道菌群的变化与 2 型糖尿病、溃疡性结肠炎、肠易激综合征等许多疾病相关^[19-20]。在正常情况下,肠道微生物群对宿主有益,细菌之间的微生态平衡对维持肠道正常功能起到重要的作用^[19]。而急性应激可能会导致这一平衡被破坏,本实验对 WIRS24 h 组和对照组的小鼠粪便进行 16S rRNA 肠道菌群测序,分析显示,对照组小鼠和 WIRS24 h 组小鼠的群落区分明显,表明 WIRS24 h 组小鼠的肠道菌群可能具有其特殊性。在门水平上,WIRS24 h 组小鼠弯曲杆菌门、脱铁杆菌门丰度显著增加,而脱硫杆菌门、放线菌门丰度明显减少。有研究显示,弯曲杆菌既是溃疡性结肠炎实验小鼠体内的促炎细菌^[21],也是导致胃肠炎的主要原因之一^[22]。脱铁杆菌在高脂饮食处理的原发性干燥综合征小鼠肠道中显著富集^[23],由于其在人类粪便样本中的相对丰度较低,因此在大多数人体研究中未注意^[24]。脱硫杆菌、放线菌在一定程度上与肠道炎症有关,溃疡性结肠炎小鼠中的脱硫杆菌丰度升高,放线菌丰度降低^[25]。应激诱导抑郁样行为的大鼠肠道脱硫杆菌水平升高^[26]。WIRS24 h 组小鼠有害菌弯曲杆菌门

丰度升高,同时有益菌放线菌门丰度降低。

在属水平上,与对照组相比,WIRS24 h 组幽门螺杆菌属、拟杆菌属、罗氏菌属、*norank_f__Ruminococcaceae_unclassified_f__Oscillospiraceae* 等相对丰度显著升高。幽门螺杆菌是革兰氏阴性菌属,是导致胃恶性肿瘤和消化性溃疡的重要原因之一^[27]。拟杆菌是重要的临床病原体,其微生物数量的增加会使脂多糖水平升高,与溃疡性结肠炎的形成有关^[28-29]。肠道罗氏菌可通过产生代谢物来预防肠道炎症并维持能量稳态,但有证据表明,罗氏菌会导致各种疾病,如炎症性肠病、2 型糖尿病和动脉粥样硬化^[30]。高脂肪饮食可诱导 *unclassified_f__Oscillospiraceae* 和 *unclassified_f__Ruminococcaceae* 增加^[31]。本实验建立的模型与以上已有研究结果一致,WIRS24 h 可使有害菌丰度增加。与对照组相比,WIRS24 h 组 *norank_f__norank_o__Clostridia_UCG-014*、脱硫弧菌属、内脏臭气杆菌属等相对丰度显著降低。*norank_f__norank_o__Clostridia_UCG-014* 能耐胃酸进入肠道,促进有益菌生长,抑制肠道有害生长,恢复肠道菌群^[29]。内脏臭杆菌丰度的降低与不同的微生物群疾病有关,如非酒精性脂肪性肝病、囊性纤维化和炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD),内脏臭杆菌及其在外膜囊泡中运输的效应分子可能在肠道上皮中发挥抗炎作用^[32]。

本研究还有一些局限之处,如设置造模时间的间隔过大,后续应该设置间隔更短的阶梯式对照组。并且 WIRS 时,小鼠体内的激素水平变化显著,还需要进一步监测其激素水平,以便探索出最佳的造模条件。综上所述,WIRS 模型会导致小鼠结肠组织病理损伤,并且出现明显的肠道菌群组成改变。实验结果不仅为急性应激造成结肠损伤提供依据,也可为筛选应激性肠道疾病治疗药物及药效研究时选择动物模型提供参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] 李军祥,陈詒,冯五金,等. 消化心身疾病中西医结合整体诊治专家指导意见 (2017 年) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(1): 9-17.
Li JX, Chen J, Feng WJ, et al. Expert guidance on integrated diagnosis and treatment of digestive psychosomatic diseases with traditional Chinese and western medicine (2017) [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2018, 26(1): 9-17.
- [2] Yariibeygi H, Panahi Y, Sahraei H, et al. The impact of stress on body function: a review [J]. EXCLI J, 2017, 16: 1057-1072.
- [3] Gao W, Wang Z, Wang H, et al. Neurons and astrocytes in ventrolateral periaqueductal gray contribute to restraint water

- immersion stress-induced gastric mucosal damage via the ERK1/2 signaling pathway [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2021, 24(8): 666–676.
- [4] Zhao DQ, Xue H, Sun HJ. Nervous mechanisms of restraint water-immersion stress-induced gastric mucosal lesion [J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(20): 2533–2549.
- [5] di Cerbo A, Carnevale G, Avallone R, et al. Protective effects of *Borago officinalis* (*Borago*) on cold restraint stress-induced gastric ulcers in rats: a pilot study [J]. Front Vet Sci, 2020, 7: 427.
- [6] Zhang D, Xiang M, Jiang Y, et al. The protective effect of polysaccharide SAFP from *Sarcodon aspratus* on water immersion and restraint stress-induced gastric ulcer and modulatory effects on gut microbiota dysbiosis [J]. Foods, 2022, 11(11): 1567.
- [7] Zhang Y, Wu S, Liu Y, et al. Acute cold water-immersion restraint stress induces intestinal injury and reduces the diversity of gut microbiota in mice [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 706849.
- [8] Mori T, Hotta Y, Nakamura D, et al. Enhancement of the RhoA/Rho kinase pathway is associated with stress-related erectile dysfunction in a restraint water immersion stress model [J]. Physiol Rep, 2021, 9(20): e15064.
- [9] Shen P, Yue Q, Fu W, et al. Apelin-13 ameliorates chronic water-immersion restraint stress-induced memory performance deficit through upregulation of BDNF in rats [J]. Neurosci Lett, 2019, 696: 151–155.
- [10] 陶睿智, 顾任钧, 夏雅雯, 等. 功能性消化不良动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 283–290.
- Tao RZ, Gu RJ, Xia YW, et al. Progress of animal models of functional dyspepsia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 283–290.
- [11] Li S, Wang Z, Yang Y, et al. Lachnospiraceae shift in the microbial community of mice faecal sample effects on water immersion restraint stress [J]. AMB Express, 2017, 7(1): 82.
- [12] Zhang Y, Duan C, Wu S, et al. Knockout of IL-6 mitigates cold water-immersion restraint stress-induced intestinal epithelial injury and apoptosis [J]. Front Immunol, 2022, 13: 936689.
- [13] 陆振华, 李阳光, 张琳, 等. 中医治疗消化系统心身疾病进展 [J]. 临床检验杂志(电子版), 2018, 7(1): 165–166.
- Lu ZH, Li YG, Zhang L, et al. Progress in treatment of psychosomatic diseases of digestive system by traditional Chinese medicine [J]. Clin Lab J Electron Ed, 2018, 7(1): 165–166.
- [14] Konturek PK, Brzozowski T, Konturek SJ, et al. Role of epidermal growth factor, prostaglandin, and sulfhydryls in stress-induced gastric lesions [J]. Gastroenterology, 1990, 99(6): 1607–1615.
- [15] Ono N, Suzuki S, Kawada K, et al. Stress decreases contraction of the colon, and the effects of stress are different among the regions of the colon [J]. J Vet Med Sci, 2022, 84(8): 1061–1064.
- [16] Li Y, Li XF, Hua G, et al. Colonic submucosal 5-HT(3) receptor-mediated somatostatin-dependent secretoinhibitory pathway is suppressed in water-immersion restraint stressed rats [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 656(1-3): 94–100.
- [17] Gong Y, Niu W, Tang Y, et al. Aggravated mucosal and immune damage in a mouse model of ulcerative colitis with stress [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(3): 2341–2348.
- [18] 殷银霞, 许雅清, 李海龙, 等. IL-1、IL-6、TNF- α 及 IFN- γ 在脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型大鼠血清及组织中的表达 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(2): 139–142.
- Yin YX, Xu YQ, Li HL, et al. Expression and significance of IL-1, IL-6, TNF- α and IFN- γ in serum and colon tissue in the rat models of ulcerative colitis with spleen and kidney Yang deficiency [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(2): 139–142.
- [19] 高倩, 王友明, 吴旧生. 肠道菌群变化对实验小鼠肠黏膜免疫的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(5): 45–49, 99.
- Gao Q, Wang YM, Wu JS. Impact of intestinal flora changes on the intestinal mucosal immunity in laboratory mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2012, 20(5): 45–49, 99.
- [20] Ghaisas S, Maher J, Kanthasamy A. Gut microbiome in health and disease: linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases [J]. Pharmacol Ther, 2016, 158: 52–62.
- [21] Xia P, Hou T, Ma M, et al. Konjac oligosaccharides attenuate DSS-induced ulcerative colitis in mice: mechanistic insights [J]. Food Funct, 2022, 13(10): 5626–5639.
- [22] Costa D, Iraola G. Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species [J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(4): e00072–e00018.
- [23] Zhang M, Liang Y, Liu Y, et al. High-fat diet-induced intestinal dysbiosis is associated with the exacerbation of Sjögren's syndrome [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 916089.
- [24] Herp S, Durai Raj AC, Salvado Silva M, et al. The human symbiont *Mucispirillum schaedleri*: causality in health and disease [J]. Med Microbiol Immunol, 2021, 210(4): 173–179.
- [25] Wu F, Lei H, Chen G, et al. *In vitro* and *in vivo* studies reveal that hesperetin-7-O-glucoside, a naturally occurring monoglucoside, exhibits strong anti-inflammatory capacity [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(43): 12753–12762.
- [26] Rao J, Xie R, Lin L, et al. Fecal microbiota transplantation ameliorates gut microbiota imbalance and intestinal barrier damage in rats with stress-induced depressive-like behavior [J]. Eur J Neurosci, 2021, 53(11): 3598–3611.
- [27] Cho J, Prashar A, Jones NL, et al. *Helicobacter pylori* infection [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2021, 50(2): 261–282.
- [28] Zhang W, Zou G, Li B, et al. Fecal microbiota transplantation (FMT) alleviates experimental colitis in mice by gut microbiota regulation [J]. J Microbiol Biotechnol, 2020, 30(8): 1132–1141.
- [29] Liu Y, Zhou M, Yang M, et al. *Pulsatilla chinensis* saponins ameliorate inflammation and DSS-induced ulcerative colitis in rats

- by regulating the composition and diversity of intestinal flora [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 728929.
- [30] Nie K, Ma K, Luo W, et al. *Roseburia intestinalis*: a beneficial gut organism from the discoveries in genus and species [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 757718.
- [31] Li M, Zhao Y, Wang Y, et al. Eugenol, A major component of clove oil, attenuates adiposity, and modulates gut microbiota in high-fat diet-fed mice [J]. Mol Nutr Food Res, 2022, 66 (20): e2200387.
- [32] Hiippala K, Barreto G, Burrello C, et al. Novel *Odoribacter splanchnicus* strain and its outer membrane vesicles exert immunoregulatory effects *in vitro* [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 575455.

[收稿日期] 2022-12-09

《中国比较医学杂志》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国比较医学杂志》再次入编《中文核心期刊要目总览》2020 年版(即第 9 版)综合性医药卫生类的核心期刊!

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评的学术水平和学术影响进行综合评价,受到学术界的广泛认同。

目前,本刊为中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

感谢编委、专家们的帮助与支持,感谢广大作者和读者朋友们的厚爱与支持。本刊编辑部将始终坚守办刊宗旨,不忘初心,严谨办刊,开拓进取,不断创新,向世界一流期刊看齐。

