

徐磊,罗小泉,瞿萍,等.大鼠肥胖抑郁模型建立及肠道菌群多样性的性别差异研究[J].中国实验动物学报,2023,31(6):743-755.

Xu L, Luo XQ, Qu P, et al. Establishment of an obesity depression model in rats and study of sex differences in gut flora diversity [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(6): 743-755.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.06.006

大鼠肥胖抑郁模型建立及肠道菌群多样性的性别差异研究

徐磊^{1#}, 罗小泉^{1#}, 瞿萍^{1,2}, 钟毅³, 张鸿³, 曾宪保³, 杨玉艳³,
刘志勇^{1*}, 洪滔^{4*}

(1. 江西中医药大学实验动物科技中心, 南昌 330004; 2. 江西省儿童医院, 南昌 330006;
3. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 4. 江西中医药大学临床医学院, 南昌 330004)

【摘要】目的 肥胖抑郁大鼠模型建立并对比研究肠道菌群多样性的变化。**方法** 采用高脂饲料喂养和 CUMS 经典造抑郁方法建立肥胖抑郁模型。将 SD 大鼠随机分为正常组(C组)、单纯肥胖组(F组)、单纯抑郁组(Y组)和肥胖抑郁组(FY组),整个造模持续5个月,通过糖水偏好实验、旷场实验和强迫游泳实验来评估大鼠抑郁样行为,检测模型鼠血清雌激素水平和血脂4项,并采集各组大鼠粪便样品,通过16S rDNA高通量测序法和生物信息分析软件分析测序结果,比较各组大鼠肠道菌群多样性的变化。**结果** 高脂饮食和 CUMS 方法成功制作肥胖抑郁鼠模型,肥胖和肥胖抑郁雌性大鼠雌激素水平明显升高,而雄性各组间雌激素水平无显著性差异。雌雄鼠的 FY 组肠道菌群 α 多样性具有显著差别,拟杆菌门和厚壁菌门 B/F 比值下降,且雄鼠肥胖抑郁 B/F 值只有雌鼠的一半左右。在属水平,研究结果表明雌雄鼠 FY 组和 F 组肠道菌群中 Blautia 等8个菌群变化一致,但是雌性与雄性在拟杆菌属等各有少量菌群的变化不一致。雌雄肥胖抑郁模型中,肠道菌群革兰氏阳性菌和阴性菌的组成出现差异, G^+ 的构成,雌性和雄性均由厚壁菌门和放线菌门构成,但构成比例不一样。 G^- 雄性主要由厚壁菌门、拟杆菌和脱硫杆菌构成,雌性的 G^- 主要由拟杆菌门、疣状体菌门和脱硫杆菌构成,构成比也不一样。**结论** 通过高脂饮食和 CUMS 联合孤养可以建立肥胖抑郁模型,但雌雄肥胖抑郁大鼠肠道菌群的组成不一致。

【关键词】 肥胖抑郁;肠道菌群;16S rDNA 测序;多样性;雌激素

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 06-0743-13

Establishment of an obesity depression model in rats and study of sex differences in gut flora diversity

XU Lei^{1#}, LUO Xiaoquan^{1#}, QU Ping^{1,2}, ZHONG Yi³, ZHANG Hong³, ZENG Xianbao³,
YANG Yuyan³, LIU Zhiyong^{1*}, HONG Tao^{4*}

【基金项目】 江西省科研基础条件平台项目(20212BCD46005),江西卫健委科技项目(202311150),江西中医药大学科技创新团队发展计划(CXTD-22004)。

Funded by the Jiangxi Provincial Scientific Research Infrastructure Platform Project (20212BCD46005), Jiangxi Health Commission Science and Technology Project (202311150), Jiangxi University of Chinese Medicine Science and Technology Innovation Team Development Program (CXTD-22004).

【作者简介】 徐磊(1999—),男,在读硕士研究生,研究方向:药学。Email:1124375389@qq.com;

罗小泉(1966—),男,教授,硕导,研究方向:实验动物学教学工作。Email:lxqdl@126.com。

#共同第一作者

【通信作者】 刘志勇(1969—),男,博士,教授,研究员,研究方向:中药药理与毒理。Email:liuzhiyong0791@163.com;

洪滔(1977—),女,硕士,实验师,研究方向:中药药理与临床。Email:372729181@qq.com。

* 共同通信作者

(1. Experimental Animal Science and Technology Center of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China. 2. Jiangxi Children's Hospital, Nanchang 330006. 3. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004. 4. Clinical Medical College of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004)

Corresponding author: LIU Zhiyong. E-mail: liuzhiyong0791@163.com; HONG Tao. E-mail: 372729181@qq.com

[Abstract] Objective To compare changes in microbial diversity in the intestines of male and female rats with obesity and depression. **Methods** An obesity and depression model was established by feeding rats a high fat diet and the cums classic depression making method. SD rats were randomly divided into control group (Group C), obese group (Group F), the depression group (Group Y), the obesity and depression group (Group FY). Five months were required for modeling. Depression-like behavior was evaluated by the sugared water preference test, open field test, and forced swimming test. The serum estrogen level and blood lipids were measured. Fecal samples were also collected. High-throughput sequencing of 16S rDNA was performed and the result were analyzed by bioinformation analysis software. Changes in intestinal flora diversity of rats in each group were compared. **Results** Obesity depression model rats were successfully established by a high-fat diet and cums method in the same countries. The estrogen level of obesity and obesity depression female rats was significantly increased, while there no significant difference was observed in the estrogen level between male groups. There was a significant difference in diversity of intestinal flora in Group FY. The B/F value was lower than that of in obesity and depression groups, and the B/F value of obesity and depression in male rats was only approximately half that of female rats. At the genus level, changes in Blautia and the other eight flora in the Group FY and Group F of male and female rats were consistent, but changes in a small number of flora in Bacteroides and other genera in females and males were inconsistent. In the male and female obesity and depression model, there were differences in the composition of Gram-positive and -negative bacteria among the intestinal flora. The composition of G^+ was Firmicutes and actinomycetes, but the proportions were different. G^- males mainly had Firmicutes, Bacteroides, and desulfitobacteria, whereas females mainly had Bacteroides, verruciformis, and desulfitobacteria with different composition ratios. **Conclusions** Significant changes in the composition and structure of intestinal flora in male and female obese and depressed rats may be related to estrogen.

[Keywords] obesity depression; gut flora; 16S rDNA sequencing; diversity; estrogen

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

肥胖症是指体内脂肪堆积过多和/或分布异常,通常伴有体重增加^[1],是一种慢代谢性疾病。抑郁症通常以长期的心情低落、思维迟缓、意志活动减退等为特征的一种精神类疾病。越来越多的研究也表明肥胖和抑郁之间存在双向关联,55%的肥胖人群可能患上终身抑郁,而抑郁人群患肥胖症的风险比一般人群增加 58%^[2]。肥胖抑郁并发可进一步地对人类健康和生活质量产生严重影响。临床研究发现抑郁发生具有性别差异^[3-5]。随着“微生物-肠-脑轴”概念的提出,不仅将肠道菌群紊乱与肥胖代谢性疾病的发生联系起来,还将肠道菌群与抑郁等精神疾病的发生联系起来^[6-7]。因此,有必要探讨不同性别的肠道菌群的变化在抑郁症的发生与发展中的作用,基于此通过建立肥胖抑郁大鼠模型,对比研究了不同性别大鼠肥胖抑郁时肠道菌群多样性的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

80 只 2 月龄 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重 180 ~ 200 g,由江西中医药大学实验动物中心提供【SCXK(赣)2018-0003】。所有大鼠均在江西中医药大学实验动物科技中心 SPF 级屏障【SYXK(赣)2017-0004】环境中饲养,温度 22 ~ 25℃、湿度 50% ~ 70%、昼夜各半,大鼠高脂饲料和大鼠基础饲料均由湖北万千佳兴公司提供。动物实验通过江西中医药大学实验动物伦理委员会批准(JZLLSC20220495)。

1.1.2 主要试剂与仪器

大鼠血脂 TC(20210921)、TG(20210830)、LDL-C(20210912)、HDL-C(20210906)及 E2(20210901)

检测试剂盒由上海赫彭生物技术有限公司提供。大鼠旷场装置由 3 部分构成:100 cm × 100 cm × 40 cm 的箱体、视频录制系统及 SMART v2. 5. 21 行为实验分析软件(西班牙 Panlab 公司),电子天平(JH03K2,北京京衡伟业科技有限公司,最小称量 0. 1 g),NanoDrop2000,PCR 仪:ABI GeneAmp® 9700 型,生物信息分析软件(美吉生物云)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理

使用 Excel 软件进行随机分组,分成正常组(C 组)、单纯肥胖组(F 组)、单纯抑郁组(Y 组)和肥胖抑郁组(FY 组)4 个组,每组 20 只大鼠(雌雄各 10 只),采取分笼孤养。C 组和 Y 组给予基础饲料喂

养和饮水,不接受任何刺激。F 组和 FY 组先给予高脂饲料喂养 90 d,3 个月后在高脂饲料喂养的同时 FY 组开始进行慢性温和不可预见性应激法(CUMS)进行抑郁造模,Y 组也进行 CUMS。CUMS 抑郁模型作为一个经典抑郁造模方法,最大程度地模拟了人类生活中的不良应激事件,与人类抑郁症的发生与发展最为接近^[6]。CUMS 应激方法包括禁食、禁水联合空瓶、45°斜笼、潮湿垫料、昼夜颠倒、冰水游泳、频闪、夹尾、超声、空笼、异味刺激 11 种刺激,每日 1 ~ 2 种,按照随机原则将这 11 种刺激随机安排于抑郁造模周期种,联合孤养,共 60 d。为避免大鼠预测刺激发生,影响最终的造模效果,应保证同一刺激不连续出现,实验建模流程见图 1。

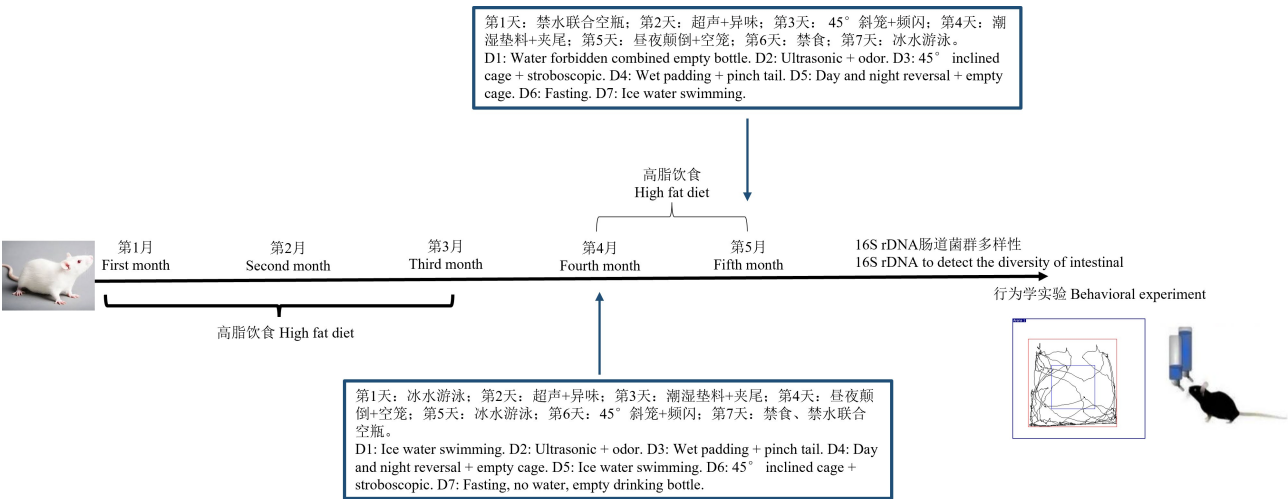


图 1 实验建模的过程

Figure 1 Experimental modeling process

1.2.2 肥胖抑郁大鼠的体重变化和行为学检测

参考文献^[8-10]方法进行旷场行为,糖水偏好实验,强迫游泳测试(FST)。

1.2.3 样本的采集

造模实验结束时,搜集粪便后迅速保存至已消毒的自封袋并做好标记,样品送至上海美吉生物医药科技有限公司,并进行 16S rDNA 基因测序。

1.2.4 粪便基因组 DNA 扩增、文库构建及测序

基因组 DNA 提取,文库构建和测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.2.5 生物学信息分析

按照 97% 相似度的条件下,利用 Uparse 软件(version 7. 0. 1090 <http://www.drive5.com/uparse/>)对所有样本进行 OTU 聚类分析,并对 OTU 进行生

物信息统计分析。基于相似水平为 97% 的 OTU 样本构建物种 Venn 图(R 语言(version 3. 3. 1));利用 R 语言工具制作稀释曲线、Rank-Abundance 曲线。使用 mothur(version v. 1. 30. 2 <https://mothur.org/wiki/calculators/>)软件对样品进行 Alpha 多样性分析。Beta 多样性分析则通过 Qiime(Version 1. 9. 1 <http://qiime.org/install/index.html>)进行。使用 R 语言(version 3. 3. 1)PCoA 统计进行分析主坐标分析,研究样本群落组成的相似性或差异性^[11-12]。

1.3 统计学分析

检测实验结果的统计分析采用 SPSS 26. 0 统计软件,实验数据均表示为平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$),采用单因素方差分析法比较组间的差异,对于方差齐性的采用 LSD 进行组间两两比较,方差不齐则采

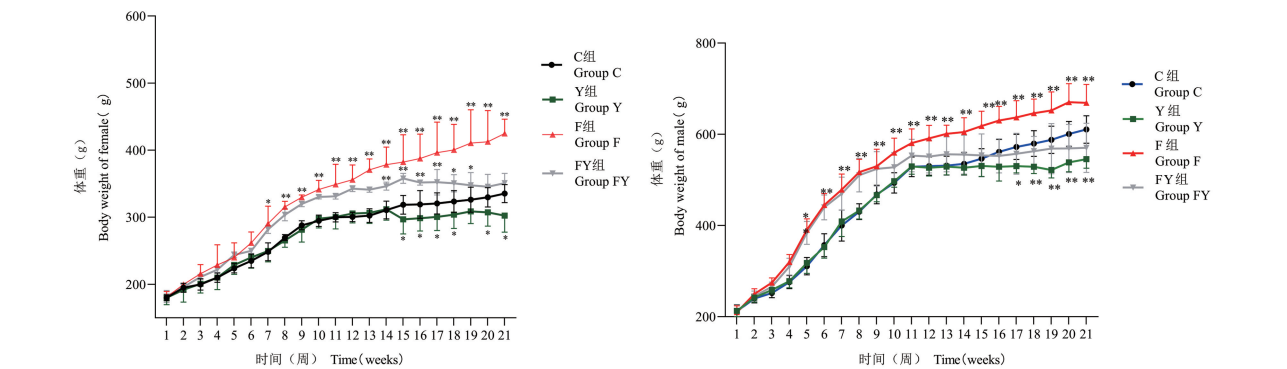
用 Dunnett *T*3 法分析, $P < 0.05$ 为差异具有研究统计学意义。最后采用 GraphPap Prism 8.0.1 做图。对菌群多组样本的物种进行显著性差异分析, $P < 0.05$ 为两组之间的差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的体重和行为学变化

FY 组动物体重增长在前期肥胖造模阶段与 F 组无异, CUMS 造模后体重略有下降, 但仍高于 C 组和 Y 组(图 2), 体重的结果显示 F 组雌雄与 C 组差异具有显著性($P < 0.01$), 但抑郁造模后使 FY 组的体重低于 F 组, 提示抑郁造模影响肥胖鼠的体重, 但与 C 组比较差异不显著。抑郁造模会显著影响动物的行为学, 抑郁症伴随多种行为表型, 其中一个重要表现是快感缺失(anhedonia), 即个体无法从奖励或愉快的活动中体验到快乐。在动物模型实验中, 通常用糖水偏好实验(sucrose preference

test, SPT)来测试快感缺失症状。糖水实验行为学指标检测造模糖水偏好均下降, 其中单纯肥胖后糖水偏好略有下降, 在肥胖基础上进行抑郁造模后雌鼠 FY 组较 F 组和 Y 组要低, 而雄性 FY 组较 F 组低, 雌雄 FY 组与 C 组相比差异具有显著性($P < 0.05$)。旷场实验(open field test, OFT)又称敞箱实验, 是一个常用的动物行为学实验。OFT 可以检测大鼠或者小鼠自发活动行为(loco-motor activity)和探索行为(exploratory behavior), 是评价实验动物在新异环境中自主行为、探究行为与紧张度的一种方法。旷场检测总距离和直立次数可以看到 3 个处理都显示与 C 组比较显著减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。强迫游泳实验以游泳的不动时间为主要指标检测动物的绝望行为, 是检测模型动物是否出现“抑郁样”行为的常用检测实验。从强制游泳的静止时间来看, FY 组、Y 组、F 组与 C 组比较游泳静止时间显著延长, 差异具有显著性($P < 0.01$)(图 3)。



注:与 C 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 2 肥胖抑郁造模体重变化

Note. Compared with group C, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Weight changes in obesity and depression modeling

2.2 大鼠血清雌激素和血脂 4 项

肥胖抑郁造模后, 检测血清中的雌激素和血脂 4 项指标, 结果如图 4 和图 5 所示。由图 4 可见, 与 C 组比较, F 组和 FY 组血清雌激素水平显著升高, 且差异具有显著性($P < 0.01$), 而雄鼠血清雌激素水平与 C 组比较, 差异不具有显著性。由图 5 可见, 与 C 组比较, 雌鼠 F 组总胆固醇、甘油三酯、高和低密度脂蛋白水平显著增加($P < 0.01$), 进行抑郁造模后, FY 组甘油三酯比 F 组有下降, 但仍高于 C 组, 胆固醇和高、低密度脂蛋白呈进一步上升趋势, 与 C 组比较, 差异具有显著性($P < 0.01$)。雄鼠的胆固醇水平和低密度脂蛋白水平, F 组和 FY 组

与 C 组比较, 差异具有显著性($P < 0.01$), 甘油三酯和高密度脂蛋白各组未见显著性差异, 抑郁造模后, FY 组的总胆固醇与低密度脂蛋白略有下降, 但与 C 组比较, 具有显著性差异($P < 0.01$)。

2.3 肠道微生物多样性分析

2.3.1 基于 OTU 的 Venn 图分析物种组成分析
如图 6 所示, 在雌鼠中, 与 C 组相比, F 组和 FY 组 OTUs 丰富度都大幅降低, Y 组 OTUs 丰度则有所增加; FY 组的物种数目比 F 组的有所增加, 而在雄鼠中, 与 C 组比较, Y 组 OTUs 丰富度反而有小幅度的下降。雌鼠的 FY 组相较于 C 组的下降幅度比雄鼠的下降幅度更小。

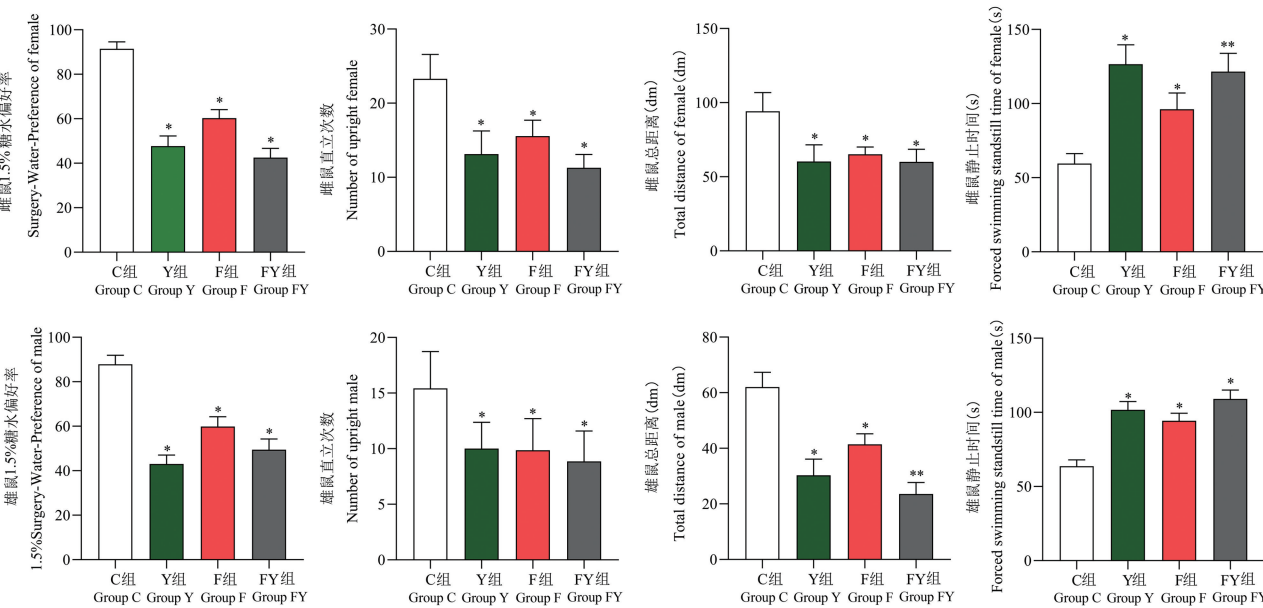


图 3 肥胖抑郁造模后行为学指标变化

Figure 3 Changes in behavioral indicators after obesity and depression molding

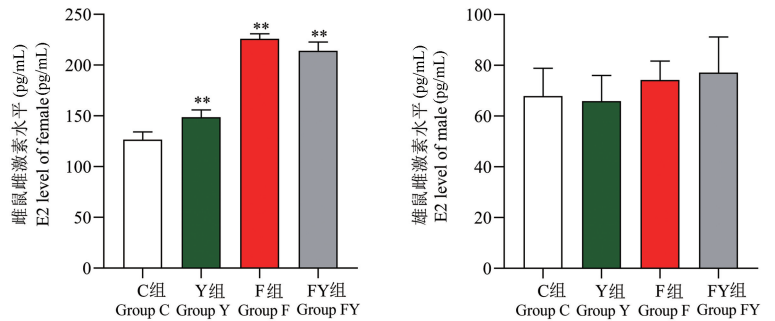


图 4 肥胖抑郁造模各组大鼠血清雌激素

Figure 4 Serum estrogen in rats in each group of obesity and depression molds

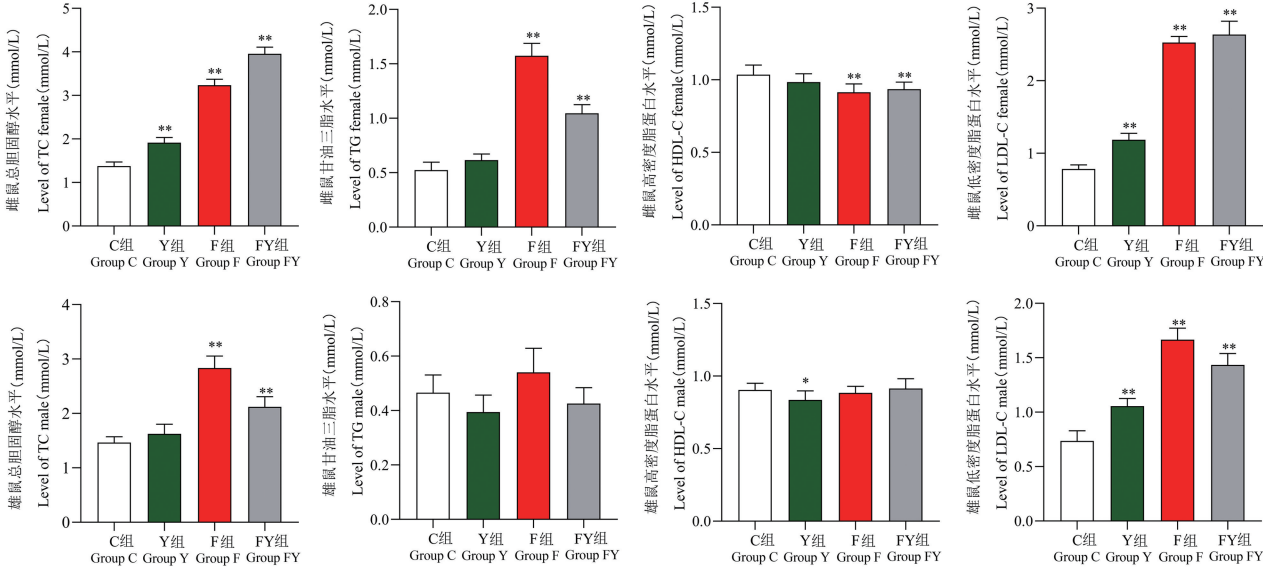


图 5 肥胖抑郁造模各组大鼠血清血脂四项

Figure 5 Four serum lipids of rats in each group of obesity and depression molds

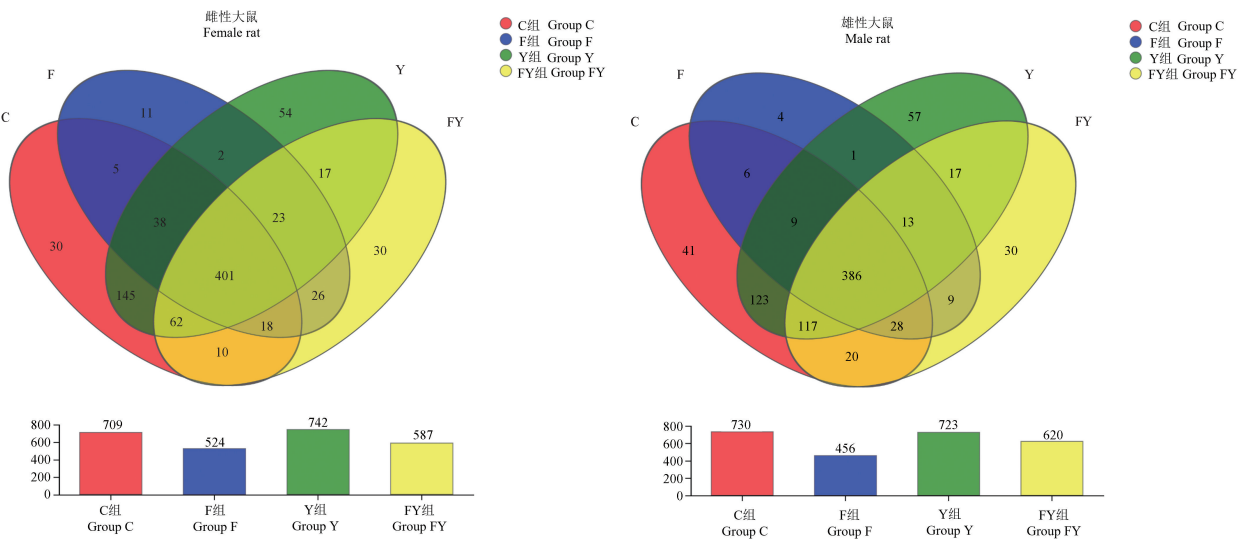


图 6 基于 OTU 的 Venn 图分析雌雄大鼠肥胖抑郁模型肠道微生物物种组成

Figure 6 Venn plot based on OTU analyzes the composition of intestinal microbial species in a male and female rat obesity and depression model

2.3.2 基于 OTU 的物种 Alpha 多样性分析

如图 7A, 7B, 7C 所示, 与 C 组雄鼠比较, Y 组 Sobs、Chao 指数上升, 但均无显著性差异, 而 F 组和 FY 组 Sobs、Chao、Ace 指数均显著下降, 且具有显著性差异 ($P < 0.05$)。从图 7D, 7E, 7F 可见, 与 C 组正常雌鼠比较, 肠道菌多样性有所下降, 但 FY 组多样性下降更显著, FY 组菌类多样性与 F 组比较未见显著性差异, 但与 Y 组比较, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。从 Shannon 指数和 Simpson 指数来看, 雄性 FY 大鼠的菌类多样性最低, 与 C 组和 Y 组比较, 具有显著性差异 ($P < 0.05$), 而与 F 组比较差异不明显 (图 7G, 7H); 而雌 Shannon 指数和 Simpson 指数各组无显著差别 (图 7I, 7J)。

2.3.3 雌雄大鼠肥胖抑郁肠道菌群物种组成分析

以门水平和纲水平分析物种相对丰度柱形图为例展示如图 8, 雄鼠的 C 组、Y 组、F 组和 FY 组的拟杆菌门与 Firmicutes 厚壁菌门之间的比值 B/F 分别为 0.60、0.53、0.24、0.12, 在雌鼠中分别是 0.66、0.65、0.50、0.27。

在雄鼠门水平上分析, 与 C 组相比, FY 组和 F 组样本中厚壁菌、放线菌门、脱硫杆菌门、疣状体菌门相对丰度显著增加 ($P < 0.01$); 但 FY 组肠道菌群中疣状体菌门相对丰度比 F 组明显减少; 拟杆菌门在 C 组为 36.78%, 而 Y 组下降为 (33.97%), F 组为 17.94%, 而 FY 组样本中相对丰度为 10.18% (图 8A); 在雌鼠门水平上分析, 与 C 组相

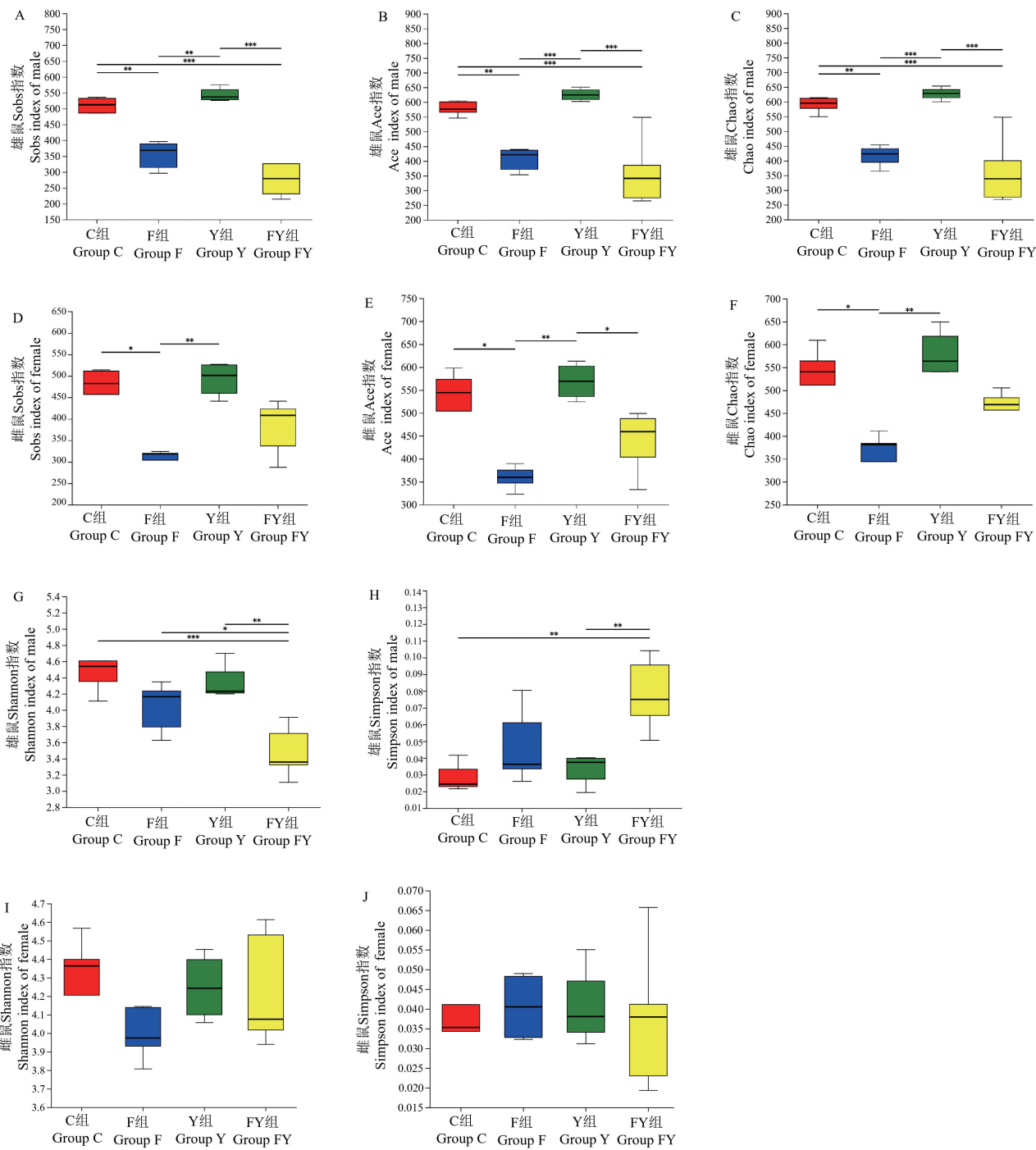
比, F 组样本中脱硫杆菌门、放线菌、疣状体菌门相对丰度水平显著升高 ($P < 0.05$), 而拟杆菌门水平显著下降 ($P < 0.05$), Y 组中厚壁菌门和拟杆菌门变化不大, FY 组的拟杆菌门相对丰度水平明显降低 ($P < 0.05$), 而脱硫杆菌门相对丰度水平明显上升 ($P < 0.05$), 且 FY 组肠道菌群中疣状体菌门相对丰度水平比 C 组、Y 组显著性上升 ($P < 0.01$), 比 F 组的疣状体菌门相对丰度显著降低 (图 8B)。

在雄鼠肠道菌群属水平分析中, 与 C 组相比, FY 组大鼠肠道菌群中有 3 个菌属相对丰度水平显著上升, 7 个菌属显著下降 (图 8C, 表 1)。在雌鼠肠道菌群的属水平分析中, 与 C 组相比, FY 组大鼠肠道菌群有 3 个菌属相对丰度水平显著上升, 7 个菌属显著下降 (图 8D, 表 2)。

群落 heatmap 图 (图 9) 显示, 在门水平和纲水平物种组成 C 组和 Y 组菌群组成更相似, 聚合在一起, 而 F 组与 FY 组的组成则更相似, 聚合成另一簇。

2.3.4 雌雄大鼠肥胖抑郁肠道菌群 β 多样性分析

β 多样性分析通过对微生物群落间的物种多样性进行组间比较分析, 进而探索不同分组样本间群落组成的相似性或差异性。由主坐标分析 (PCoA 分析) 结果如图 10 所示, 在雌鼠和雄鼠中, F 组和 FY 组的菌落组成与 C 组、Y 组有明显差异。而在雄鼠中 C 组和 Y 组以及 F 组和 FY 组的样本间多样性差异较小, 组成差异解释度分别为 47.43%、10.96% (图 10A, 10B); 图 C 箱线图代表雄性不同组样本在



注: A ~ E: 雄性各组 Sobs、Ae、Chao、Shannon 和 Simpson 指数; F ~ J: 雌性各组 sobs、ac、chao、Shannon 和 Simpson 指数。

图 7 雌雄大鼠抑郁模型肠道菌群群落丰富度的比较

Note. A ~ E. Sobs, Ae, Chao, Shannon and Simpson indices of male groups respectively. F ~ J. sobs, ac, chao, Shannon and Simpson indices of female groups respectively.

Figure 7 Comparison of intestinal flora richness in male and female rat models of depression

PC1 轴上的分布离散情况。在雌鼠中 C 组和 Y 组菌群组成结构十分接近,重叠面积较大。但雌鼠的 FY 组菌群组成与 C 组的接近程度比雄鼠更近(图 10D,10E),图 F 箱线图代表雄性不同组样本在 PC1 轴上的分布离散情况。

2.3.5 雌雄大鼠肥胖抑郁模型肠道菌群的组间物种组成差异分析

雄鼠样本中,与 C 组比较,F 组的差异菌群为厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门、脱硫杆菌门、疣状体菌门、cyanobacteria 和 patescibacteria 呈现显著性差

表 1 各组雄鼠肠道菌群属水平排名前十的差异菌群变化表

Table 1 Table of changes in the top ten differential flora of male rats in each group

菌名称 Name of flora	C 组 Group C	F 组 Group F	Y 组 Group Y	FY 组 Group FY
肠鼠菌属 <i>Norank_f_muribaculaceae Muribaculaceae</i>	23.01	9.35 ↓	21.64 ↓	4.63 ↓
毛螺菌属 <i>Unclassified_f_Lachnospiraceae</i>	7.73	13.99 ↑	5.85 ↓	17.79 ↑
布劳特菌属 <i>Blautia</i>	2.01	18.13 ↑	0.67 ↓	17.62 ↑
乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	15.28	1.76 ↓	14.69 ↓	6.07 ↓
普雷沃蒂拉科 <i>UCG-001prevotellaceae-UCG-001</i>	5.71	4.38 ↓	3.57 ↓	0.83 ↓
梭状芽胞杆菌 <i>UCG-014 norank_f_norank_o_Clostridia_UCG-014</i>	5.29	0.86 ↓	6.90 ↑	0.40 ↓
瘤胃球菌属格纳瓦组 <i>Ruminococcus_gnavus_group</i>	5.29	2.41 ↓	0.26 ↓	9.14 ↑
瘤胃球菌属 <i>UCG-005</i>	6.24	2.00 ↓	3.51 ↓	0.00 ↓
普雷沃蒂拉科 <i>NK3B31 Prevotellaceae_NK3B31_GROUP</i>	3.09	1.04 ↓	5.22 ↑	0.81 ↓
瘤胃球菌属 <i>Ruminococcus</i>	3.26	1.76 ↓	3.07 ↓	0.35 ↓

表 2 各组雌鼠肠道菌群属水平排名前十的差异菌群变化表

Table 2 Table of changes in the top ten differential microbiota of female mice in each group

菌名称 Name of flora	C 组 Group C	F 组 Group F	Y 组 Group Y	FY 组 Group FY
肠鼠菌属 <i>Norank_f_muribaculaceae Muribaculaceae</i>	19.98	15.08 ↓	19.34 ↓	12.29 ↓
乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	11.81	2.97 ↓	13.16 ↑	6.88 ↓
毛螺菌属 <i>Lachnospiraceae</i>	6.86	9.29 ↑	5.72 ↓	12.04 ↑
布劳特菌属 <i>Blautia</i>	2.38	16.17 ↑	0.69 ↓	6.74 ↑
拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	3.64	10.33 ↑	0.41 ↓	3.49 ↓
普雷沃蒂拉科 <i>NK3B31 菌属 Prevotellaceae_NK3B31_GROUP</i>	6.81	0.44 ↓	8.90 ↑	0.93 ↓
普雷沃蒂拉科 <i>UCG-001 菌属 Prevotellaceae-UCG-001</i>	6.22	1.98 ↓	5.98 ↓	2.67 ↓
梭状芽胞杆菌 <i>UCG-014 菌属 Norank_f_norank_o_Clostridia_UCG-014</i>	2.29	0.39 ↓	8.32 ↑	1.46 ↓
瘤胃球菌属 <i>Ruminococcus</i>	4.63	1.06 ↓	3.92 ↓	2.80 ↓
产粪甾醇真杆菌属 <i>Norank_f_Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	1.76	1.44 ↓	3.67 ↑	2.65 ↑

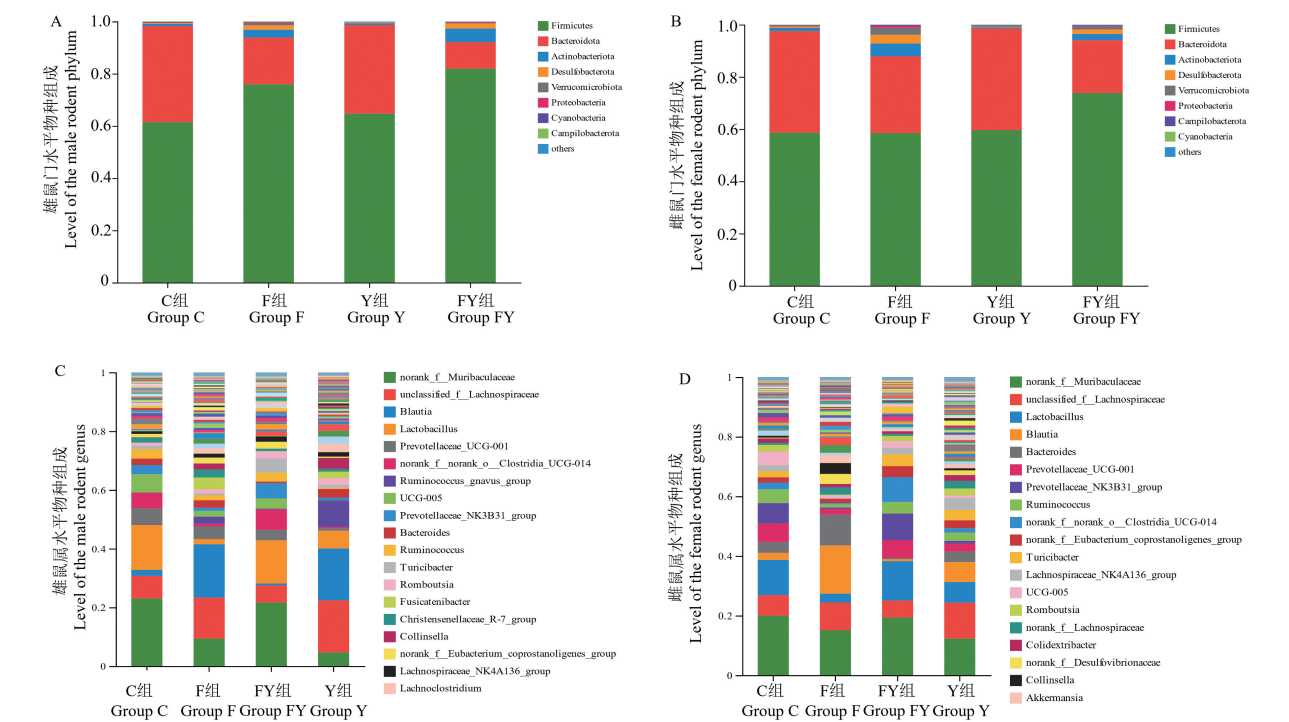


图 8 雌雄大鼠肥胖抑郁肠道菌群门水平和属水平物种组成分析

Figure 8 Species composition analysis at the phytopheroid level and class level of obesity and depression intestinal flora in male and female rats

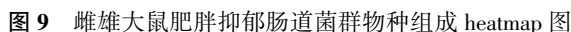


Figure 9 Obesity and depression intestinal flora species in male and female rats make up heatmap diagram

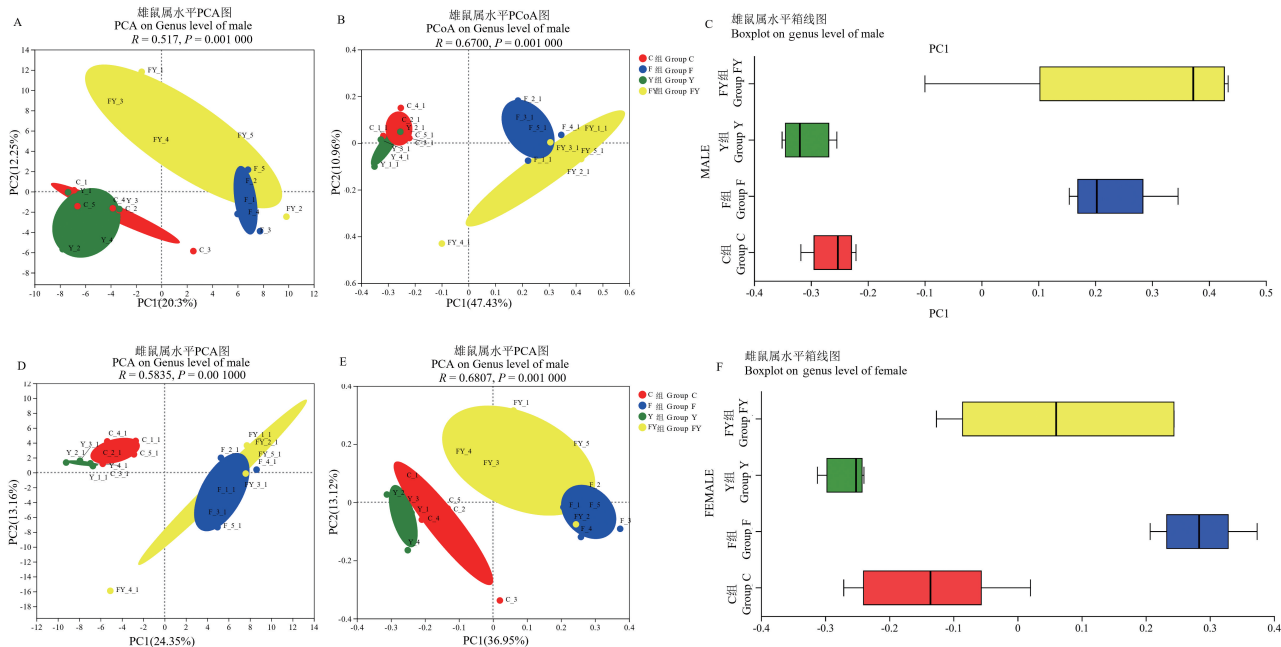
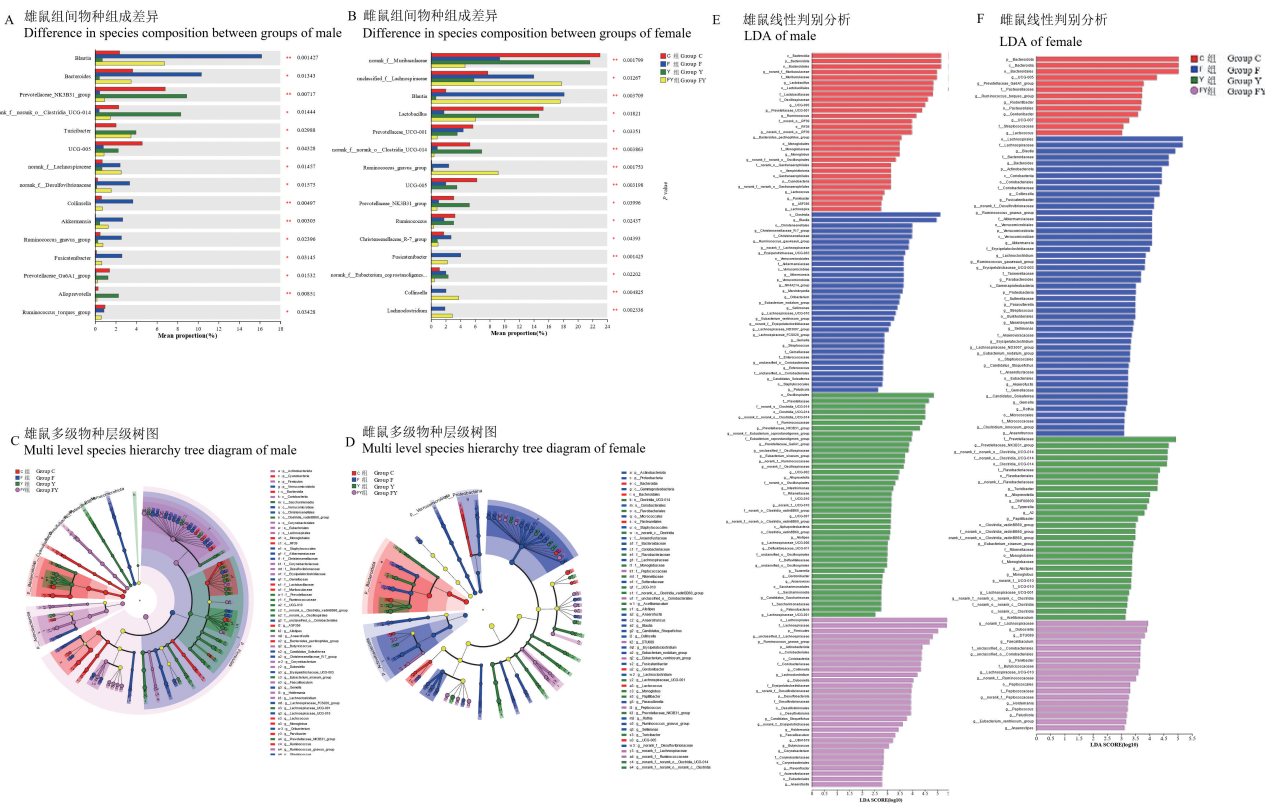


图 10 雌雄大鼠肥胖抑郁模型肠道菌群 β 多样性分析

Figure 10 Analysis of intestinal flora β diversity in male and female rats with obesity and depression

脱硫杆菌门、cyanobacteria 和 patescibacteria 呈现显著性差异(图 11A)。

在雌鼠各组间的差异情况:与 C 组比较,F 组的疣状体菌和 proteobacteria 达到显著性差异,与 FY 组比较,拟杆菌门和疣状体菌门达到显著差别,与 Y 组比较疣状体菌门和 proteobacteria 达到显著差别。F 组与 Y 组比较,放线菌门、疣状体菌



注:A(雄),B(雌)的Y轴表示某一分类学水平下的物种名,X轴表示物种不同分组中平均相对丰度,不同颜色的柱子表示不同分组;右边为P值(One-way ANOVA, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$);C(雄),D(雌)不同颜色节点表示在对应组别中显著富集,且对组间差异存在显著影响的微生物类群;淡黄色节点表示在不同分组中均无显著差异,或对组间差异无显著影响的微生物类群;E(雄),F(雌)的LDA判别柱形图统计多组中有显著作用的微生物类群,通过LDA分析(线性回归分析)获得的LDA分值,LDA分值越大,代表物种丰度对差异效果影响越大。

图 11 雌雄大鼠肥胖抑郁模型肠道菌群的组间物种组成差异分析

Note. The Y axis of A (male), B (female) indicates the species name at a certain taxonomic level, the X axis represents the average relative abundance in different groups of species, and the columns of different colors represent different groups. On the far right is the P value (One-way ANOVA, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). C (male), D (female) different color nodes indicate microbial taxa that are significantly enriched in the corresponding group and have a significant impact on the differences between groups. Pale yellow nodes indicate microbial taxa that do not differ significantly between groups, or have no significant effect on differences between groups. The LDA discriminant histogram of E (male) and F (female) counts microbial taxa with significant effect in multiple groups, and the LDA score obtained by LDA analysis (linear regression analysis), the larger the LDA score, the greater the impact of species abundance on the difference effect.

Figure 11 Analysis of differences in species composition between intestinal flora in male and female rats with obesity and depression

proteobacteria、patescibacteria、deferribacterota 菌门具有显著性差异, FY 组与 F 组比较, 仅有 proteobacteria 具有显著性差异, FY 组与 Y 组比较, 拟杆菌门、放线菌门、proteobacteria、patescibacteria 出现差异(图 11B)。

LEfSe 多级物种层级树图(图 11C, 11D), 物种差异判别采用线性判别分析(LDA)来估算每个组物种丰度对差异效果影响的大小, 并比较从门到属的菌群变化。雄鼠样本中 FY 组厚壁菌门 Bacilli 纲 Erysipelatoclostridiaceae 目等超过 31 个 LDA > 2 的物种发生显著富集(图 11E)。在雌鼠样本中, 有厚

壁菌门的 Clostridia 纲 Butyricicoccaceae 科等 18 个 LDA > 2 的物种在 FY 组显著富集(图 11F)。

2.3.6 雌雄大鼠肥胖抑郁模型肠道菌群功能预测及表型预测

雌雄大鼠肥胖抑郁模型肠道菌群功能预测均与碳水化合物和能量代谢有关(图 12A, 12B)。肥胖抑郁有可能降低大鼠的菌群丰富度, 尤其是会重塑肠道菌群中革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的比例。根据物种组成和表型贡献度分析可知, G^+ 的构成, 雄性主要由厚壁菌门和放线菌门构成, 其中 C 组的厚壁菌门构成占比为 61.68%, Y 组为

65.83%, F 组为 86.34%, FY 组为 89.77% (图 12C), 雄性 G^- 主要由厚壁菌门、拟杆菌和脱硫杆菌构成, C 组的拟杆菌门构成占比为 33.55%, Y 组为 31.19%, F 组为 0.09%, FY 组为 0.04% (图 12D); 雌性 G^+ 的构成, 主要也是由厚壁菌门和放线菌门构成, 其中 C 组的厚壁菌门构成占比为 63.99%, Y 组

为 59.62%, F 组为 75.66%, FY 组为 80.51%, 而放线菌门和 C 组相比, F 组升高, Y 组下降, FY 组介于 F 组和 Y 组之间(图 12E), 雌性的 G^- 主要由拟杆菌门和疣状体菌门、脱硫杆菌等构成, C 组的拟杆菌门构成占比为 31.69%、Y 组为 37.46%、F 组为 13.97%、FY 组为 12.78% (图 12F)。

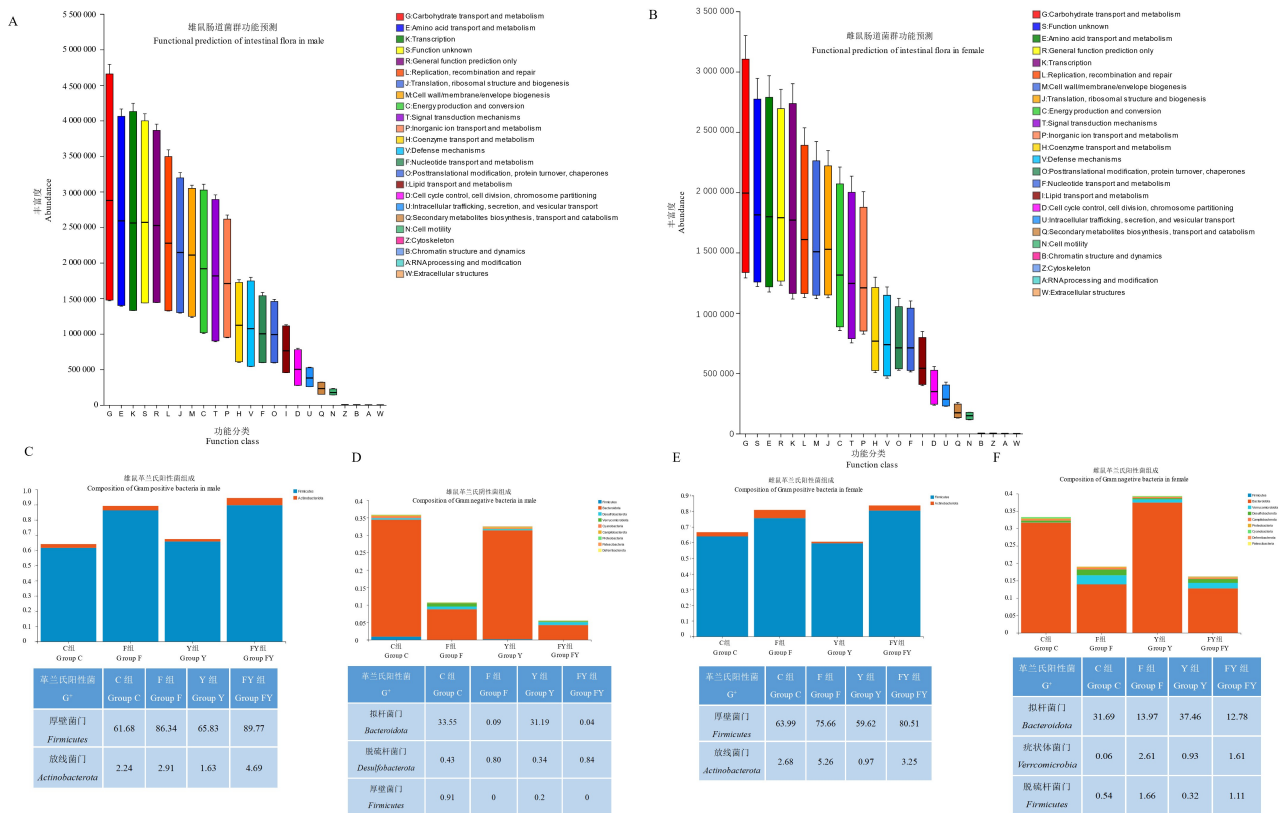


图 12 雌雄大鼠肥胖抑郁模型肠道菌群的功能预测及表型预测

Figure 12 Functional prediction and phenotypic prediction of intestinal flora in male and female rat obesity and depression models

3 讨论

在高脂饲料喂养 2 个月后, F 组体重与 C 组比较出现显著性差异 ($P < 0.05$), 血脂 4 项指标中总胆固醇和低密度脂蛋白与正常对照组比较, 也具有显著性差异 ($P < 0.05$), 提示肥胖造模成功。在此基础上, 进行抑郁造模, 从行为学指标来看, 肥胖抑郁大鼠的糖水偏好与 C 组比较出现显著性差异 ($P < 0.05$), 在肥胖基础上进行抑郁造模后 FY 组较 F 组低, 与单纯抑郁造模的抑郁 Y 组比较也要低; 旷场检测总距离和直立次数可以看到 3 个组的指标都显示与 C 组比较显著减少 ($P < 0.05$); 从强制游泳的静止时间来看, FY 组、Y 组、F 组与 C 组比较游

泳静止时间显著延长, 差异具有显著性 ($P < 0.05$), 提示肥胖抑郁的造模也是成功的。

越来越多的研究发现肠道微生物与大脑之间存在“微生物-肠-脑”轴, 多项研究发现肠道微生物与肥胖、大脑和精神活动有关, 肠道微生物一方面可以影响多种正常的心理过程^[13-14], 另一方面在认知功能障碍和抑郁症等精神类疾病中也有肠道菌群的变化。调查发现抑郁症人群中放线杆菌和肠杆菌丰度较高, 有益菌中双歧杆菌、乳酸菌等的丰度下降, G^- 菌增加, 而抑郁等消失通常会伴随肠道微生物群落的变化, 当纠正肥胖人群肠道微生物的失调后也发现其神经病理和认知功能的改善, 说明肠道微生物与物质代谢和神经系统有着密切的关

联^[15-16]。短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs) 作为信号分子,是微生物与其宿主相互作用的重要媒介,不仅参与机体能量代谢、肥胖的形成,也参与抑郁的发生发展^[17-18]。临床发现抑郁发生的性别差异是存在的,本研究发现肥胖抑郁造模后,雌雄大鼠肠道菌群多样性和丰度变化确有不同。

首先发现雌性 F 组和 FY 组雌激素明显升高,且与 C 组比较差异具有显著性,而雄性各组雌激素水平各组无显著性差异。

接着对不同性别肥胖抑郁模型鼠肠道菌群的分析后发现造模导致了肥胖抑郁肠道微生物菌群多样性的下降,在门水平, F 组和 FY 组的拟杆菌门 (Bacteroidota) 与厚壁菌门 (Firmicutes) 之间的比值 B/F 下降, B/F 比值可作为肥胖菌群的标签,特别是动物模型中肥胖者的肠道菌群 B/F 值较 C 组低^[19-20],本研究的结果与这一结论相符合,实验中雌鼠和雄鼠的 FY 组和 F 组的 B/F 值均比 C 组低,且雌雄鼠的 FY 组的 B/F 值比 F 组和 Y 组的 B/F 更低,且雄鼠 FY 组的 B/F 值只有雌鼠的一半左右。在属水平,研究结果表明雌雄鼠 FY 组和 F 组肠道菌群中 Blautia 等 8 个菌群变化一致,但是雌性与雄性在拟杆菌属等各有两个菌群的变化不一致。

进一步观察了雌雄肥胖抑郁模型中,肠道菌群革兰氏阳性菌和阴性菌的组成也出现差异, G⁺ 的构成,雌雄性均由由厚壁菌门和放线菌门构成,但构成比例不一样。G⁻ 雄性主要由厚壁菌门、拟杆菌和脱硫杆菌构成,雌性的 G⁻ 主要由拟杆菌门和疣状体菌门、脱硫杆菌构成,构成比也不一样。在雄鼠的 FY 组的大鼠肠道菌群中 Fusicatenibacter ($P < 0.01$) 相对丰度显著上升,这与有研究发现 Fusicatenibacter 属 (属于革兰氏阳性菌) 在 FY 组的肠道主要作用菌群包括 Fusicatenibacter 属的结果^[21]相似。说明 Fusicatenibacter 有可能导致雄性大鼠抑郁;在雌鼠的 F 组和 FY 组的 norank_f_desulfovibrionaceae (属于革兰氏阴性菌) ($P < 0.05$) 相对丰度显著增加,而 norank_f_desulfovibrionaceae 作为肠道中有害菌,这可能与雌性大鼠肥胖和肥胖抑郁的发生有关。

4 结论

本研究发现,肥胖抑郁造模会对大鼠肠道菌群物种的组成、丰富度和多样性造成显著的影响,在门水平,肥胖抑郁造模使拟杆菌门 (Bacteroidota) 与

厚壁菌门 (Firmicutes) 之间的比值 B/F 下降,且雄鼠下降更为显著,在属水平,雌雄鼠肥胖抑郁 FY 组和肥胖 F 组肠道菌群中 Blautia 等 8 个菌群变化一致,但是雌性与雄性在拟杆菌属等各有两个菌群的变化不一致。肠道的革兰氏阳性和革兰氏阴性菌群组成相似但比例不同,属水平上看,革兰氏阳性菌 Fusicatenibacter 有可能导致雄性大鼠抑郁,而未分类的属于革兰氏阴性菌的 desulfovibrionaceae 可能与雌性大鼠肥胖和肥胖抑郁的发生有关。

参 考 文 献 (References)

- [1] 谢炳煜, 何艾舟, 李婷, 等. 有氧运动对肥胖大鼠内皮功能障碍和内脂素的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30 (4): 533-539.
Xie ZY, He AZ, Li T, et al. Effect of aerobic exercise on endothelial dysfunction and visfatin in obese rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 533-539.
- [2] 尚晓静, 邵海琳, 王晓来, 等. 肥胖和抑郁共同生物学机制研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2021, 34(21): 3715-3718.
Shang XJ, Shao HL, Wang XL, et al. Research progress on common biological mechanism of obesity and depression [J]. J Med Theory Pract, 2021, 34(21): 3715-3718.
- [3] 傅联聪, 赵海丰. 肥胖与抑郁的关联机制研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(80): 148-149.
Fu LC, Zhao HF. Research progress on the mechanism of obesity and depression [J]. World Latest Med Inf, 2019, 19(80): 148-149.
- [4] Luppino FS, de Wit LM, Bouvy PF, et al. Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies [J]. Arch Gen Psychiatry, 2010, 67(3): 220-229.
- [5] Bolgiano M, Fuller S, Aldret R, et al. Associations of salivary adiponectin and body fat percentage to depression, anxiety and stress [J]. Psychoneuroendocrinology, 2019, 100: S31.
- [6] Kelly JR, Borre Y, O'Brien C, et al. Transferring the blues: depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat [J]. J Psychiatr Res, 2016, 82: 109-118.
- [7] Barandouzi ZA, Starkweather AR, Henderson WA, et al. Altered composition of gut microbiota in depression: a systematic review [J]. Front Psychiatry, 2020, 11: 541.
- [8] 姜宁, 张亦文, 姚彩虹, 等. 大小鼠抑郁行为实验方法概述 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 830-838.
Jiang N, Zhang YW, Yao CH, et al. Overview of animal behavioral tests of depression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 830-838.
- [9] 许丽娥, 赵静洁, 杜仪, 等. 塞来昔布对疼痛抑郁共病大鼠行为学及中枢炎症的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(1): 1-4.
Xu LE, Zhao JJ, Du Y, et al. Effect of celecoxib on behavior and central inflammatory in rats with pain accompanied by

depression [J]. J Clin Exp Med, 2021, 20(1): 1-4.

[10] Hu C, Luo Y, Wang H, et al. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0185129.

[11] 陈雨然, 伍庆华, 罗琪, 等. 右旋柠檬烯对双酚 A 影响下人源乳腺癌 MDA-MB-231 裸鼠移植瘤生长及肠道菌群的影响 [J]. 江西科学, 2022, 40(1): 51-55, 153.

Chen YR, Wu QH, Luo Q, et al. Effect of D-limonene on the growth and intestinal flora of human breast cancer MDA-MB-231 transplanted in nude mice affected by bisphenol A [J]. Jiangxi Sci, 2022, 40(1): 51-55, 153.

[12] Niu M, Zhao Y, Xiang L, et al. 16S rRNA gene sequencing analysis of gut microbiome in a mini-pig diabetes model [J]. Anim Models Exp Med, 2022, 5(1): 81-88.

[13] 廖冬梅, 庞芳, 杨云昊, 等. 基于肠道菌群探讨电针对 APP/PS1 小鼠认知能力的改善机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(10): 1774-1783.

Liao DM, Pang F, Yang YH, et al. Based on the intestinal flora, this paper discusses the mechanism of electroacupuncture to improve the cognitive ability of APP/PS1 mice [J]. Chin J Pathophysiol, 2021, 37(10): 1774-1783.

[14] Liang S, Wu X, Jin F. Gut-brain psychology: rethinking psychology from the microbiota-gut-brain axis [J]. Front Integr Neurosci, 2018, 12: 33.

[15] Ma W, Song J, Wang H, et al. Chronic paradoxical sleep deprivation-induced depression-like behavior, energy metabolism and microbial changes in rats [J]. Life Sci, 2019, 225: 88-97.

[16] Saiyasit N, Chunchai T, Prus D, et al. Gut dysbiosis develops before metabolic disturbance and cognitive decline in high-fat diet-induced obese condition [J]. Nutrition, 2020, 69: 110576.

[17] Schroeder BO, Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease [J]. Nat Med, 2016, 22(10): 1079-1089.

[18] Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(3): 473-493.

[19] Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(31): 11070-11075.

[20] Finucane MM, Sharpton TJ, Laurent TJ, et al. A taxonomic signature of obesity in the microbiome? Getting to the guts of the matter [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84689.

[21] 李秀川, 刘春芳, 杨婷婷, 等. 乳腺癌病人焦虑抑郁情绪与肠道菌群的相关性研究 [J]. 肠外与肠内营养, 2021, 28(5): 267-274.

Li XC, Liu CF, Yang TT, et al. Correlation between anxiety and depression and intestinal flora in patients with breast cancer [J]. Parenter Enter Nutr, 2021, 28(5): 267-274.

[收稿日期] 2022-08-23

《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信任。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。