

李笑琳,杨丽萍,侯俊林,等.五行音乐对孕期恐应激子代抑郁行为及肠道菌群的影响[J].中国比较医学杂志,2025,35(2):13-23.

Li XL, Yang LP, Hou JL, et al. Effects of five-element music on depressive behaviors and intestinal flora in offspring of stress-injured pregnant rats [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(2): 13-23.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.02.002

五行音乐对孕期恐应激子代抑郁行为及肠道菌群的影响

李笑琳¹,杨丽萍^{1*},侯俊林¹,王耀辉¹,余晨阳¹,李玲玲²

(1.河南中医药大学中医学院,郑州 450046;2.河南中医药大学第一附属医院,郑州 450000)

【摘要】 目的 探究五行音乐对孕期恐应激子代抑郁样行为和肠道菌群的影响。**方法** 将 36 只孕 0.5 d Wistar 雌鼠随机分为空白组、恐应激组和五行音乐组,所产仔鼠延续母代分组。孕 1~19 d 恐应激组和五行音乐组孕鼠采用旁观电击法造模,同时五行音乐组予五行音乐干预。采用旷场实验、酶联免疫吸附法(ELISA)检测孕 20 d 孕鼠恐惧行为及血清糖皮质激素(glucocorticoid,GC)含量评价造模效果;采用旷场、悬尾和糖水偏好实验评价 3 周龄仔鼠抑郁情绪;采用高效液相检测仔鼠海马神经递质去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)、多巴胺(dopamine,DA)和 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)水平;采用 16S rRNA 测序分析仔鼠肠道菌群变化规律;采用蛋白质免疫印迹(Western blot)实验检测仔鼠近端结肠蛋白 Claudin1、Occludin 和 ZO1 的表达。**结果** 与空白组相比,恐应激组孕鼠旷场周围区域停留时间延长($P<0.05$),进入中心区域次数减少($P<0.001$),血清 GC 水平升高($P<0.001$),而五行音乐组逆转了恐应激组的行为学变化($P<0.05$)及血清 GC 水平($P<0.001$)。相较空白组,恐应激组仔鼠旷场穿格次数减少($P<0.01$)、糖水偏好指数降低、悬尾不动时间延长($P<0.05$),海马内 NE、DA、5-HT 显著减少($P<0.05$),肠道菌群多样性下降($P<0.01$),菌群结构显著改变,其中变形菌门、肠杆菌科、肠球菌属、埃希氏菌属等丰度上调($P<0.05$),螺旋体门、螺旋体科、毛螺菌科、瘤胃球菌科、密螺旋体属、普雷沃氏菌属、粪球菌属、异杆菌属、瘤胃球菌属、多尔氏菌属等丰度下调($P<0.05$),近端结肠蛋白 Claudin1、Occludin 和 ZO1 表达量显著下调($P<0.05$);相较恐应激组,五行音乐组仔鼠穿格次数、糖水偏好指数回升、悬尾不动时间缩短($P<0.05$),海马内 DA、5-HT 显著回升($P<0.05$),肠道菌群物种多样性增加($P<0.01$),且逆转了上述菌群丰度变化,近端结肠蛋白 Occludin 和 ZO1 表达量显著上调($P<0.05$)。**结论** 孕期五行音乐干预能有效改善孕期恐应激所致子代抑郁样行为及肠道菌群紊乱。

【关键词】 五行音乐;恐应激;子代;抑郁;肠道菌群

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 02-0013-11

Effects of five-element music on depressive behaviors and intestinal flora in offspring of stress-injured pregnant rats

LI Xiaolin¹, YANG Liping^{1*}, HOU Junlin¹, WANG Yaohui¹, YU Chenyang¹, LI Lingling²

(1. Traditional Chinese Medicine School, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【基金项目】国家自然科学基金(81973596);河南省中医药科学研究专项课题(2023ZY2032,2024ZY1001);河南省卫生健康委国家中医药传承创新中心科研专项(2023ZXZX1013)。

【作者简介】李笑琳(1993—),女,在读硕士研究生,研究方向:儿童情志疾病的中医药防治。E-mail:lixl1823619@126.com

【通信作者】杨丽萍(1966—),女,博士,教授,研究方向:情志疾病的中医药防治。E-mail:biolyip@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of five-element music on depressive behaviors and intestinal flora in offspring of fear-stress rats during pregnancy. **Methods** Thirty-six 0.5-day pregnant Wistar rats were divided randomly into a control group, fear-stress group, and five-element music group, and the subsequent litters continued the maternal grouping. Pregnant rats in the fear-stress and five-element music groups were modeled on days 1~19 of gestation using the bystander electric method, while the five-element music group was also exposed to Feather Tune five-element music intervention. The fear behavior and serum glucocorticoid (GC) levels in pregnant rats were assessed on day 20 of pregnancy by open field test and enzyme-linked immunosorbent assay, respectively, to evaluate the effectiveness of the model. Depression in 3-week-old offspring was evaluated by open field, tail suspension, and sucrose preference tests. Norepinephrine (NE), dopamine (DA), and 5-hydroxytryptamine (5-HT) levels in the hippocampus of the offspring were measured by high-performance liquid chromatography. Changes in the intestinal flora of the offspring were analyzed by 16S rRNA sequencing. Expression levels of the proximal colonic proteins claudin1, occludin, and ZO1 in the offspring were measured by Western blot assay. **Results** Pregnant rats in the fear-stress group stayed longer in the area around the open field ($P<0.05$), had fewer entries into the central area ($P<0.001$), and had higher serum GC levels compared with those in the blank group ($P<0.001$). In contrast, five-element music exposure reversed these behavioral changes ($P<0.05$) and serum GC levels ($P<0.001$) in the fear-stress group. Offspring in the fear-stress group exhibited decreased open-field crossing frequency ($P<0.01$), reduced sucrose preference index, and longer immobility time in the tail suspension test ($P<0.05$), compared with those in the blank group, together with significantly decreased NE, DA, and 5-HT levels in the hippocampus ($P<0.05$). Rats in the fear-stress group showed decreased diversity of the intestinal flora ($P<0.01$) and significant alterations in flora structure, including higher abundance of *Proteobacteria*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, and *Escherichia* ($P<0.05$), and lower abundance of *Spirochaetes*, *Spirochaetaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Treponema*, *Prevotella*, *Coprococcus*, *Allobaculum*, *Ruminococcus*, and *Dorea* ($P<0.05$). The proximal colonic proteins Claudin1, Occludin, and ZO1 were significantly downregulated ($P<0.05$). The open-field crossing frequency, sucrose preference index, and duration of tail suspension immobilization were improved in the five-element music group compared with those in the fear-stress group ($P<0.05$), while DA and 5-HT levels were significantly restored in the hippocampus ($P<0.05$), species diversity of the intestinal flora increased ($P<0.01$) and changes in the abundance of the flora were reversed, and the proximal colonic proteins Occludin and ZO1 expression were significantly upregulated ($P<0.05$). **Conclusions** Five-element music intervention during pregnancy can ameliorate fear-stress-induced depression behaviors and intestinal flora disorders in the offspring.

【Keywords】 five-element music; fear-stress; offspring; depression; intestinal flora

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

随着社会竞争压力的增加,孕妇抑郁和焦虑等负面情绪极为普遍,孕期负性情绪不仅对母体的身心健康构成威胁,还可致使子代出现近远期情志异常^[1]。恐惧应激是孕期常见的心理应激类型,母亲孕期恐应激的子代相较正常子代情绪行为异常的风险明显增加^[2]。然而,由于孕期药物干预容易伤及胎儿,仅有 14% 遭受负性情绪困扰的孕妇接受过适当的治疗^[3],因此,迫切需要开发并推广安全有效的孕期干预措施来改变这一现状。

五行音乐是由中医五行理论推衍至乐理而形成的传统音乐疗法,通过不同调式乐曲调节经

络气血,改善脏腑功能,因其安全性高、治疗方案个体化等优势被广泛应用于临床抑郁、焦虑等精神类疾病并取得良效^[4],然而五行音乐能否通过调理孕妇情绪来改善孕期恐应激对子代情志的不良影响尚缺乏深入的实验研究,改善孕期恐应激子代情志的作用机制更待阐明。肠道菌群可通过调节代谢途径等方式影响大脑的发育和行为,现代研究表明肠道菌群紊乱是精神类疾病如抑郁症的重要病理基础^[5]。故本研究初步探讨五行音乐对孕期恐应激子代抑郁情绪及肠道菌群的影响,旨在为孕期恐应激致胎损提供早期预防的科学依据,探索安全可行的干预策略。

1 材料和方法

1.1 实验动物

7 周龄 SPF 级 Wistar 大鼠购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2021-0006]。雌鼠 36 只,雄鼠 18 只,体重 260~320 g,饲养于河南中医药大学实验动物中心[SYXK(豫)2021-0015],温度(23±2)℃,湿度 45%~55%,食水自由,12 h/12 h 光照黑暗交替。本实验研究过程严格遵守“3R 原则”,并获得河南中医药大学实验动物福利伦理委员会正式批准(IACUC-S202311028)。

1.2 主要试剂与仪器

大鼠糖皮质激素(glucocorticoid, GC)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司, MM-21058R1); 色谱级甲醇(天津四友, 632352-64487); 抗体 β -actin (Servicebio, GB15003); 抗体 ZO1 (Servicebio, GB115686); 抗体 Occludin (Servicebio, GB111401); 抗体 Claudin1 (Servicebio, GB112543); HRP 标记的山羊抗兔 IgG (Servicebio, GB23303)。

电击箱(自制); 旷场实验箱(江苏赛昂斯生物技术有限公司); 动物行为学分析软件(ANY-maze)(美国 Stoeling, Edition 1.0); 酶标分析仪(美国 Rayto, RT-6100); 正置光学显微镜(广州明美, FM-43M); 低温研磨仪(上海净信, JXFSTPRP-CL-48); 高速低温离心机(大龙, D1524R); 超高效液相色谱仪(美国 Thermo, Vanquish Flex); 电泳仪(伯乐, Mini-PROTEAN Tetra Cell); 化学发光仪(Servicebio, SCG-W3000)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

适应饲养 1 周后选取旷场实验评分相近的大鼠,按照雌雄 2:1 于 20:00 合笼受孕,次日 8:00 结合阴栓或阴道涂片法检测雌鼠是否受孕,受孕大鼠记为妊娠 0.5 d,未受孕雌鼠继续合笼至受孕。36 只孕鼠随机分为空白组、恐应激组和五行音乐组,每组 12 只,造模干预及行为学实验结束后,每组随机选取 6 只孕鼠剪尾取血进行模型评价,除去流产及假孕大鼠,每组保留 6 只孕鼠至自然分娩,其子代(仔鼠)延续母代分组,形成 3 个子代组,每窝随机选取两只仔鼠用以后续实验研究。

1.3.2 模型建立及评价

恐应激组和五行音乐组孕鼠通过旁观电击法构建恐应激模型。造模所用电击箱由亚克力玻璃制成,划分为 9 个 15 cm×15 cm×30 cm 的小室,底部整体由数十根平行排列间隔约 2 cm 的导电铁丝构成,位列中间的 4 个小室为电击室,其余为旁观室,小室间隔玻璃板均匀散布直径 1 cm 小孔以传递声音和气味,旁观室底部放置一块 7 cm×7 cm×12 cm 的纸板,供旁观孕鼠在电击发生时逃避使用。通过视觉、听觉和嗅觉,孕鼠能感知到被电击的雄鼠所释放的恐惧信号,从而产生恐惧应激反应。具体造模方法如下:将被电击雄鼠置于电击室,恐应激组和五行音乐组孕鼠分次置于旁观室,每 2 min 内连续鸣响警报 60 s,鸣响同时予 25 mA 电流均匀电击 6 次(每次电击持续 2 s,8 s 后再电击 2 s),循环 15 次共计 30 min,每天 1 次,连续造模 19 d。空白组孕鼠仅放置于造模箱中不予刺激。造模期间,模型孕鼠呈现蜷缩、呼吸急促和失禁,空白组精神良好、行动活跃。以模型孕鼠血清 GC 水平明显高于空白组($P < 0.05$)为造模成功。

1.3.3 五行音乐选取及干预方式

根据五音应五脏原则进行辨证施乐,羽音属水通肾,可润下涵木、激发固志,与恐伤肾模型鼠同气相求,因此五行音乐组给予《中国传统五行音乐(正调式)》中的羽调音乐干预。于孕第 1~20 天每天 17:00~19:00 播放音乐 2 h,音量为 55~65 dB。

1.3.4 旷场实验

将孕 20 d 孕鼠放置于尺寸为 80 cm×80 cm×35 cm 的黑色敞口塑料箱中,箱底被平均分为 25 个(5 行×5 列)正方形小格(16 cm×16 cm),外周 16 格为周围区域,中心 9 格为中心区域,先自由探索 2 min,之后使用行为学实验系统记录并分析 5 min 内周围区域停留时间和进入中心区域次数。3 周龄仔鼠旷场实验操作同孕鼠,记录仔鼠运动总路程和穿格次数。实验过程保持环境安静、光照均匀,每只鼠实验结束后进行粪便清理和 75%酒精对器具喷洒擦拭消毒,以消除气味对后续实验动物的影响。

1.3.5 仔鼠蔗糖偏好实验

3 周龄仔鼠第 1 天予 2 瓶 2%蔗糖水自由饮

用 24 h, 第 2 天将其中 1 瓶蔗糖水替换成自来水, 饮用 12 h 后左右交换两水瓶位置, 第 3 天禁水不禁食 24 h 后, 予 2% 蔗糖水饮用 12 h, 记录蔗糖水消耗量、计算糖偏好率。糖水偏好指数/% = 消耗蔗糖水量/蔗糖水总量 $\times 100\%$ 。

1.3.6 仔鼠悬尾实验

将 3 周龄仔鼠分别用胶布粘尾端(距尾尖 1 cm 处)于横杆成倒挂状态, 仔鼠为克服倒挂体位进行剧烈挣扎, 挣扎后出现间断静止, 即为绝望状态。观察 6 min, 记录后 4 min 内仔鼠不动时间。

1.3.7 孕鼠标本采集及模型评价

孕鼠于孕 20 d 旷场实验结束后, 随机选取 6 只进行剪尾取血, 离心 (3000 r/min, 15 min) 分离血清, 后采用 ELISA 法严格遵循试剂盒操作说明检测孕鼠血清 GC 含量。

1.3.8 高效液相检测仔鼠海马单胺类神经递质

每组随机选取 3 周龄仔鼠各 8 只, 麻醉后断头迅速取双侧海马组织置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。采用高效液相色谱法检测海马区 NE、DA、5-HT 含量, 称取待测海马组织样本, 按照 1 g:10 mL 比例加入 0.2 mol/L 高氯酸, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下组织匀浆 10 min, 低温离心 2 次 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 14 000 r/min, 15 min), 取上清液过滤后待测。检测条件: Agilent C18 色谱柱, 流动相 A 为磷酸盐缓冲液, pH=2.62。流动相 B 为甲醇。流速 0.8 mL/min, 柱温 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样温度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量 20 μL 。制备梯度浓度为 500 ng/mL、250 ng/mL、125 ng/mL、62.5 ng/mL 和 31.25 ng/mL 的标准品溶液, 色谱分析后绘制各神经递质标准曲线。

1.3.9 仔鼠粪便标本采集及检测

3 周龄仔鼠于无菌环境下采集粪便, 粪便排出前用 75% 酒精棉签消毒大鼠肛周, 用镊子夹持 1 粒粪便放入已标记的冻存管, 立即置于液氮速冻, 后转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存待 16S rRNA 检测, 具体方法采用 CTAB 法对样本的基因组 DNA 进行提取, 用 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACNNGGTTATCTAAT-3') 引物对 V3+V4 可变区进行 PCR 扩增。引物合成及 DNA 测序委托深圳微科盟科技公司完成。

1.3.10 Western blot 检测仔鼠近端结肠屏障蛋白表达水平

将仔鼠近端结肠制备组织匀浆液, 经裂解变

性后上样, 凝胶蛋白电泳, 电泳至溴酚蓝离最底部大约 1 cm 终止电泳, 转膜 30 min, 室温下牛奶封闭 30 min, 加入一抗(兔抗 β -actin 抗体稀释倍数 1:5000, 兔抗 ZO1、兔抗 Occludin 及兔抗 Claudin1 抗体稀释倍数均为 1:1000)后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日二抗(羊抗兔二抗稀释倍数均为 1:3000)室温孵育 1 h, ECL 处理后曝光, 以上实验重复 3 次。通过 Image J 1.54g 软件对原始条带进行灰度值分析, 以 β -actin 为内参计算蛋白相对表达水平, 样本指标相对表达量 = 指标灰度值/内参灰度值。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计学分析。计量资料均以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$), 对于服从正态分布且满足方差齐性检验的资料采用单因素方差分析, 否则采用 Kruskal-Wallis 检验。肠道菌群数据采用深圳微科盟科技集团有限公司生科云平台进行统计分析。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 五行音乐对恐应激模型孕鼠应激水平的影响

相较空白组, 恐应激组旷场周围区域停留时间延长 ($P<0.05$)、进入中心区域次数减少 ($P<0.001$), 而五行音乐组逆转了恐应激组上述行为学指标 ($P<0.05$), 见表 1。ELISA 测血清 GC 含量显示, 恐应激组孕鼠血清 GC 含量升高 ($P<0.001$), 五行音乐干预可缓解恐应激升高的 GC 水平 ($P<0.001$), 见图 1。以上结果提示恐应激造模成功且五行音乐可明显改善孕鼠应激水平。

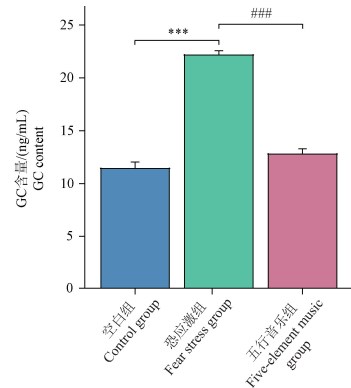
2.2 五行音乐干预对孕期恐应激致子代抑郁样行为的影响

与空白组相比, 孕期恐应激组仔鼠旷场实验中穿梭次数显著减少 ($P<0.01$), 悬尾实验不动时间增加、糖水偏好指数降低 ($P<0.05$); 而孕期五行音乐干预逆转了子代抑郁样行为的增加 ($P<0.05$)。各组旷场运动总路程无显著差异。见表 2。

2.3 五行音乐干预对孕期恐应激子代海马单胺类神经递质的影响

与空白组相比, 孕期恐应激组仔鼠海马 NE、DA、5-HT 含量均显著减少 ($P<0.05$), 与模型组

仔鼠相比,五行音乐组仔鼠海马 DA、5-HT 含量显著增加($P<0.05$),后两组间 NE 含量差异无统计



注:与空白组相比,*** $P<0.001$;与恐应激组相比,### $P<0.001$ 。

图 1 五行音乐对孕鼠血清 GC 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Note. Compared with control group, *** $P<0.001$. Compared with fear-stress group, ### $P<0.001$.

Figure 1 Effect of five-element music on Serum GC content in pregnant rats($\bar{x}\pm s, n=6$)

学意义。见表 3。

2.4 五行音乐干预对各组仔鼠肠道菌群的影响

2.4.1 五行音乐对孕期恐应激子代肠道菌群 α 多样性的影响

各组仔鼠肠道菌群 α 多样性由表 4 中 4 项指标反映。与空白组相比,恐应激组仔鼠 Chao1 指数和 OUT 数目显著降低($P<0.01$),与恐应激组相比,五行音乐组 Chao1 指数和 OUT 数目显著上调($P<0.01$);Shannon 指数和 Simpson 指数各组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4.2 五行音乐对孕期恐应激子代肠道菌群 β 多样性的影响

基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析(PCoA)结果如下,样本距离越远提示物种结构差异越大。结果提示孕期恐应激显著改变子代肠道菌群结构,孕期五行音乐的干预使菌群结构更接近于正常。具体结果见图 2。

表 1 五行音乐对孕鼠恐惧行为的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effects of five-element music on fear behavior and serum GC content in pregnant rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别 Groups	旷场周围区域时间/s Open field around time	进入中心区域次数/n Open field center entries times
空白组 Control group	263.12±17.53	15.20±4.39
恐应激组 Fear-stress group	284.32±6.86*	7.40±2.59***
五行音乐组 Five-element music group	270.47±14.45#	12.20±3.16#

注:与空白组相比,* $P<0.05$,*** $P<0.001$;与恐应激组相比,# $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group,* $P<0.05$,*** $P<0.001$. Compared with fear-stress group,# $P<0.05$.

表 2 五行音乐对仔鼠抑郁行为的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 Effects of five-element music on depressive behavior of young rats($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别 Groups	旷场总距离/m Open field total distance	旷场穿梭次数/n Open field line crossings times	悬尾不动时间/s TST immobility time	糖水偏好指数/% Sucrose preference index
空白组 Control group	14.69±2.93	138.42±23.30	98.83±18.38	76.84±11.00
恐应激组 Fear-stress group	13.43±2.30	112.42±8.27**	124.17±17.52*	60.55±14.96*
五行音乐组 Five-element music group	14.13±2.36	126.00±15.04#	102.08±25.47#	74.74±13.52#

注:与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与恐应激组相比,# $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$. Compared with fear-stress group,# $P<0.05$.

表 3 五行音乐对仔鼠海马单胺类神经递质的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 3 Effects of five-element music on hippocampal neurotransmission in young rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别 Groups	NE/(ng/g)	DA/(ng/g)	5-HT/(ng/g)
空白组 Control group	272.39±47.36	284.93±80.62	275.12±57.76
恐应激组 Fear-stress group	195.22±42.65**	171.30±18.96*	184.44±41.15**
五行音乐组 Five-element music group	232.29±47.81	236.46±54.10 [#]	251.00±39.90 [#]

注:与空白组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与恐应激组相比, [#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with fear-stress group, [#] $P<0.05$.

表 4 五行音乐对仔鼠肠道菌群 α 多样性的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 4 Effects of five-element music on intestinal flora α diversity of offspring rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别 Groups	Chao1 指数 Chao1 index	OUT 数目 OTU number	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index
空白组 Control group	543.42±39.80	542.38±39.62	5.33±0.64	0.91±0.04
恐应激组 Fear-stress group	392.11±74.39**	391.25±69.44**	4.66±0.89	0.87±0.08
五行音乐组 Five-element music group	631.19±135.47 ^{##}	629.88±135.51 ^{##}	5.59±0.92	0.9±0.06

注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与恐应激组相比, ^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with fear-stress group, ^{##} $P<0.01$.

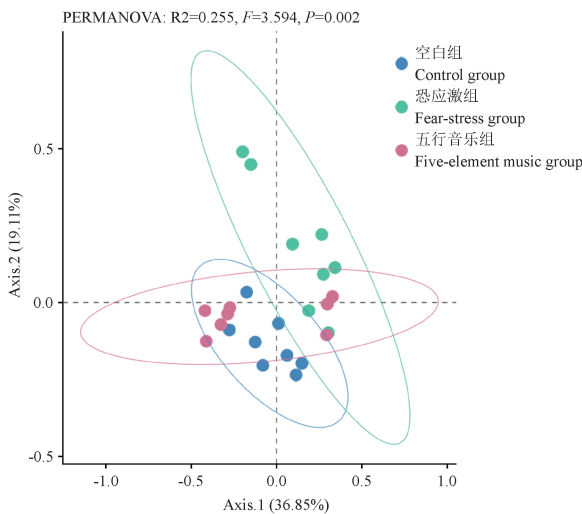


图 2 仔鼠肠道菌群 PCoA 降维分析

Figure 2 PCoA dimension reduction analysis of intestinal flora in offspring rats

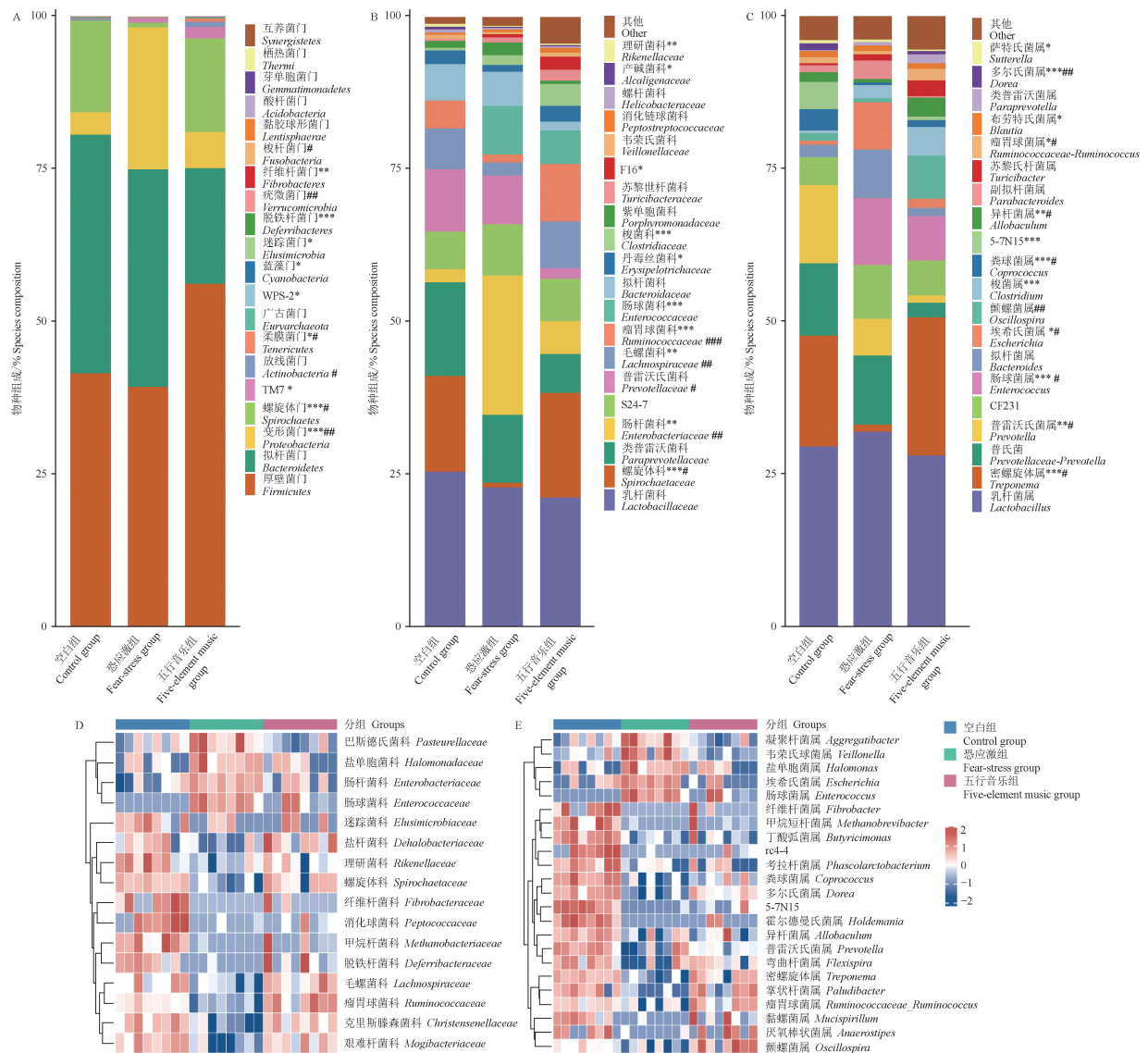
2.4.3 五行音乐对孕期恐应激子代肠道菌群物种组成的影响

以门、科、属三水平为代表的物种组成分析发现各组优势菌群发生改变。与空白组相比,门水平绝对丰度排名前 5 位的菌门中,恐应激组仔鼠肠道菌群变形菌门(*Proteobacteria*)丰度上调,

螺旋体门(*Spirochaetes*)丰度下调($P<0.001$),这两种菌门在五行音乐组中的绝对丰度被明显逆转($P<0.05$),见图 3A。科水平丰度前 20 位中,恐应激组上调了肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)丰度,下调螺旋体科(*Spirochaetaceae*)、毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae*)丰度($P<0.01$),五行音乐干预有效逆转了上述科水平菌群变化($P<0.05$),见图 3B;属水平绝对丰度排名前 20 位中,恐应激组较空白组上调肠球菌属(*Enterococcus*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)丰度,同时下调了密螺旋体属(*Treponema*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、粪球菌属(*Coprococcus*)、异杆菌属(*Allobaculum*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae-Ruminococcus*)、多尔氏菌属(*Dorea*)共 6 种菌属绝对丰度($P<0.05$),五行音乐组同样逆转了恐应激组的以上菌属表现($P<0.05$),见图 3C;图 3D、3E 分别为 3 组各样本科、属水平上部分差异物种的相对丰度热图,更直观地呈现出差异菌群的组间变化趋势。

2.4.4 五行音乐对孕期恐应激子代肠道菌群功能的影响

为了进一步探讨五行音乐改善抑郁表型的



注:A:门水平物种组成分析;B:科水平物种组成分析;C:属水平物种组成分析;D:科水平差异物种丰度热图;E:属水平差异物种丰度热图。空白组与恐应激组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;五行音乐组与恐应激组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图3 物种组成分析及差异物种相对丰度热图

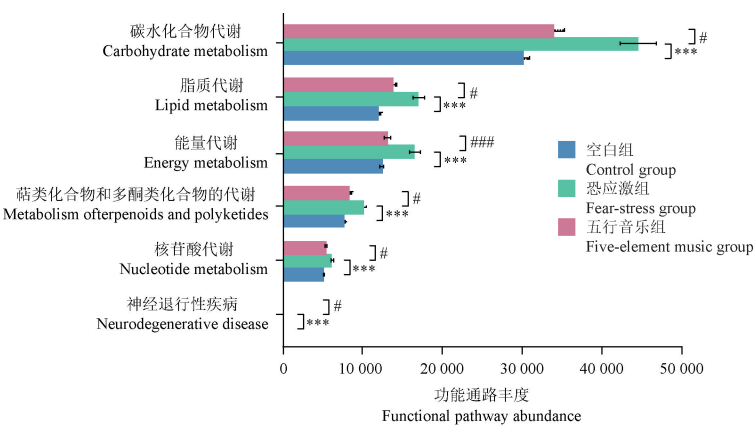
Note. A, Phylum level species composition analysis. B, Family level species composition analysis. C, Genus level species composition analysis. D, Heat map of species abundance at family level. E, Heat map of species abundance at genus level. Control group was compared with fear-stress group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Five-element music was compared with fear-stress group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 3 Species composition analysis and heat map of relative abundance of different species

潜在肠道菌群相关机制,使用 PICRUSt2 基于测序结果通过 KEGG 数据库进行功能预测分析。与空白组相比,恐应激组子代菌群的碳水化合物代谢、脂质代谢、能量代谢、萜类化合物和多酮类化合物代谢、核苷酸代谢及神经退行性疾病功能丰度增加($P<0.001$),与恐应激组相比,五行音乐组仔鼠的上述代谢功能发生逆转($P<0.05$)。见图4。

2.5 五行音乐干预对各组仔鼠结肠屏障蛋白表达的影响

如图5所示,与空白组相比,孕期恐应激组仔鼠近端结肠蛋白 Claudin1、Occludin、ZO1 表达水平均显著降低($P<0.05$),与恐应激组相比,五行音乐组仔鼠近端结肠蛋白 Occludin、ZO1 表达量显著增加($P<0.05$),Claudin1 蛋白出现上调趋势

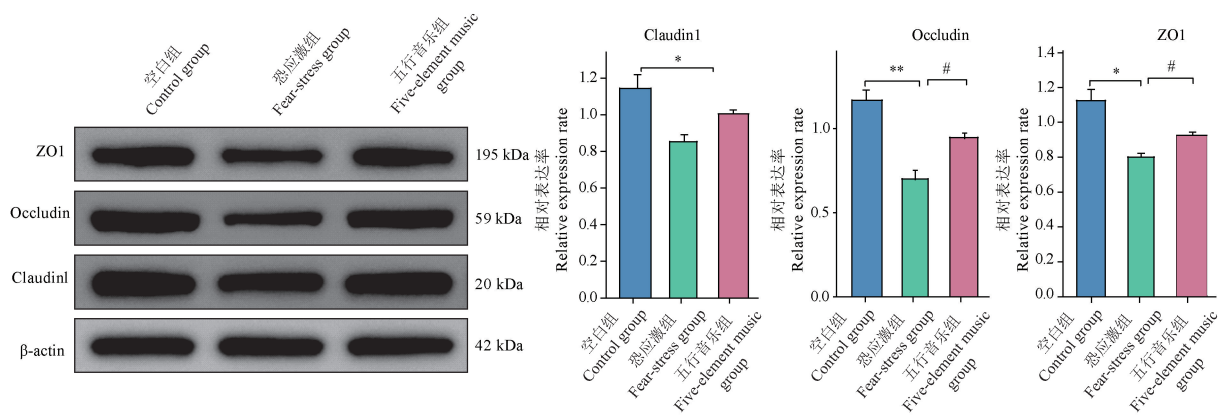


注:与空白组相比, *** $P<0.001$;与恐应激组相比, # $P<0.05$, ### $P<0.001$ 。

图 4 KEGG 二级差异功能通路丰度图

Note. Compared with control group, *** $P<0.001$. Compared with fear-stress group, # $P<0.05$, ### $P<0.001$.

Figure 4 KEGG secondary differential functional pathway abundance chart



注:与空白组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与恐应激组相比, # $P<0.05$ 。

图 5 五行音乐对仔鼠近端结肠屏障蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with fear-stress group, # $P<0.05$.

Figure 5 Effect of five-elements music on the expression of proximal colonic barrier proteins in littermates ($\bar{x}\pm s, n=3$)

但差异无统计学意义。

3 讨论

孕期应激可以导致子代发育受损的结局已被广泛证实,母亲产前应激可导致后代抑郁样行为增加^[6]。中医古籍《妇科玉尺》载:“恐伤肾,气下,母气既伤,子气应之。”孕期恐应激可致子代肾气损伤,髓海不充,元神失养,导致子代胚胎时期禀赋减弱进而对子代情志产生不利影响。本实验以孕期恐应激为模型,采用旁观电击法造模,有效避免了传统应激造模法对实验动物造成的生理损伤,确保研究是基于孕期单纯恐惧心理

应激对子代情志的影响^[7]。旷场实验中,动物周围区停留时间和中心区进入次数反映其趋触性,即对边缘的偏好,是评价恐惧情绪的公认指标^[8]。恐惧应激形成的神经冲动经由中枢系统投射到相应脑区从而激活下丘脑-垂体-肾上腺皮质(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴,导致机体肾上腺皮质迅速合成 GC 并释放入血,通过介导神经递质的转换等途径参与恐惧反应的调节^[9]。血清 GC 含量可反映机体 HPA 轴激活情况及应激水平,且诸多研究已证实恐惧模型大鼠血清 GC 水平显著高于正常组大鼠^[10],因此将血清 GC 水平显著升高作为评价恐应激模型制备

成功的标准之一。本研究通过旷场实验结果和血清 GC 水平对比确认造模后孕鼠处于应激状态,提示恐应激模型成功,而五行音乐干预有效改善孕鼠恐惧行为,缓解了恐应激的不良效应,明确五行音乐干预的有效性,也为进一步研究对子代影响的实验提供了前提条件。

子代因孕期胎损进而引发出生后的发育问题及行为异常。本研究发现孕期恐应激子代在旷场实验中穿格次数减少,而旷场运动总路程未见显著差异,提示孕期恐应激会抑制子代自发活动及兴奋程度,但对其运动能力并无明显影响,这与既往研究发现相一致^[11]。悬尾实验中孕期恐应激子代不动时间延长,表明模型组子代无助行为增加。本研究同样发现孕期恐应激子代糖水偏好率降低,提示孕期恐应激子代存在快感缺失现象。此外,恐应激组仔鼠海马区域的单胺类神经递质水平显著降低,这些神经递质的变化被认为是促进抑郁发病的关键因素^[12]。以上行为学表现及脑内生化指标的改变均证实孕期恐应激确实会导致子代抑郁样行为增加。鉴于孕期治疗的特殊需求,音乐和心理疗法成为干预孕期不良情绪的首选,已有研究证实音乐治疗干预与心理或药物治疗在改善抑郁症疗效方面无差异,音乐疗法作为一种非药物干预手段,在抑郁症治疗中的独特优势及巨大潜力^[13-14]。而五行音乐是中医基于天人合一整体观念及五行学说开创的以“五音内动五脏”为理论前提的音乐疗法体系,其中,羽音通肾,乐调广阔幽微、含蓄沉静,具有沉降敛藏作用,可助养固摄肾精而治过恐^[15]。徐海燕等^[16]应用五行音乐改善肿瘤患者抑郁焦虑状态,刘丽等^[17]发现五行音乐可有效减轻卒中后抑郁患者抑郁水平,效果优于抗抑郁药物艾司西酞普兰。因此,本实验选取羽调音乐干预以改善孕期恐伤肾所致胎损。结果表明,五行音乐干预不仅显著改善母代不良情绪及应激水平,并能有效减少子代抑郁样行为及平衡脑内神经递质水平,为五行音乐防治孕期应激致胎损的临床推广提供了实验依据。

微生物-肠-脑轴是抑郁情绪障碍形成与进展中重要的双向调节系统^[3],肠道微生物群在其中起着复杂且关键的作用,对抑郁症状的产生和调节具有确切影响^[18]。另有研究表明,子代肠道

微生物的早期建立,主要通过母亲的垂直传递及环境接触,其来源可能由母体多处微生物源如肠道、阴道、口腔及皮肤等部位的微生物群构成^[19]。本实验粪菌取自 3 周龄哺乳阶段幼鼠,确保肠道微生物群落的连续传递及相对一致的生长环境。本研究 α 多样性结果提示恐应激组仔鼠较空白组肠道菌群多样性显著降低,与抑郁患者通常的低多样性失调表现一致^[20],五行音乐孕期干预则显著提升肠道菌群物种多样性。同时与空白组比较,恐应激组仔鼠菌群结构也发生显著变化,五行音乐干预可以逆转这种变化,使之更接近空白组菌群结构,提示孕期恐应激可致子代肠道菌群结构紊乱,而五行音乐干预可有效纠正菌群结构的失衡。

多项研究表明变形杆菌可导致小鼠抑郁,且其数量与抑郁程度呈正相关^[20-22],本实验结果也发现恐应激组仔鼠变形杆菌丰度上调,变形杆菌可通过诱导中枢系统 NF- κ B 激活及海马区炎症因子水平显著上调导致小鼠抑郁^[21],而五行音乐孕期干预可逆转变形杆菌的丰度失衡。已有研究分析抑郁症患者肠道菌群较健康组肠杆菌科丰度升高,瘤胃球菌属、普雷沃氏菌属、多尔氏菌属、粪球菌属等丰度降低^[23],瘤胃球菌属等菌属可产生丁酸等短链脂肪酸,后者在维护肠道屏障和调节免疫反应中至关重要,丁酸缺乏会打破微生物平衡引起兼性厌氧致病菌如大肠杆菌等丰度增加,促发免疫炎症反应,内毒素释放入血影响大脑神经发育,从而导致抑郁发病^[22];另有研究提示抑郁的改善与毛螺菌科丰度显著增加相关^[24]。LIN 等^[25]通过移植健康粪菌降低有害菌埃希氏菌属从而改善肠易激综合征患者的抑郁行为,本实验中五行音乐同样可逆转恐应激所致的仔鼠埃希氏菌属丰度升高。WU 等^[26]研究发现异杆菌属与螺旋体科和丙酸水平呈显著正相关,并探讨阐述了菌群相关的抑郁发病机制,与五行音乐上调异杆菌属和螺旋体科趋势从而改善抑郁相一致。这些抑郁相关肠道菌群改变在孕期恐应激组仔鼠中均有出现,更重要的是,五行音乐有效逆转了仔鼠上述肠道菌群的丰度变化,且这种调节作用与其抗抑郁作用的发挥是同步的。为进一步探究五行音乐改善抑郁可能的肠道菌群机制,本研究基于差异菌群对二级差异

功能进行富集分析,发现五行音乐干预可影响子代已被证实与抑郁相关的代谢通路,如碳水化合物代谢、脂质代谢、能量代谢等多种代谢途径^[27],再次提示五行音乐改善恐应激子代抑郁样行为可能与维持肠道菌群稳态及其正常代谢关联密切。此外,肠道菌群失调可导致肠道屏障功能障碍,肠道通透性增加可促使有害物种及其代谢物如炎症因子穿过肠道进入循环及免疫系统,干扰肠道微生物与大脑之间的双向通信,从而损害机体的情绪调节、神经发育和认知功能^[28]。本研究发现孕期恐应激子代近端结肠屏障蛋白的表达显著下降,而孕期五行音乐治疗修复了模型组子代屏障蛋白的异常表达,再次证实了五行音乐在改善孕期恐应激致子代抑郁病理机制中的客观作用。

综上所述,五行音乐能够改善孕期恐应激子代的抑郁样行为,本研究揭示了针对胎源性精神类疾病有效可行的干预策略,首次从肠道菌群及神经递质的角度初步探讨了五行音乐改善孕期应激导致的子代抑郁样行为的潜在机制,证明了孕期应激的音乐疗法对子代情志异常的有效性,为其临床推广提供了基础研究依据,同时为孕期应激引发的子代精神障碍开辟新的治疗视角和研究方向。尽管五行音乐具备改善母子两代负性情绪的潜力,但其具体如何调控肠道菌群及神经递质进而发挥抗抑郁作用的机制仍待进一步深入研究与论证。

参考文献:

- [1] SCARBOROUGH J, IACHIZZI M, SCHALBETTER S M, et al. Prenatal and postnatal influences on behavioral development in a mouse model of preconceptional stress [J]. *Neurobiol Stress*, 2024, 29: 100614.
- [2] 刘岳轩, 杨丽萍, 丁申奥, 等. 基于 16S rRNA 探究孕期“恐伤肾”对仔鼠情绪及肠道菌群的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(7): 3098-3102.
LIU Y X, YANG L P, DING S A, et al. Effects of “fear impairing kidney” during pregnancy on emotion and intestinal flora of offspring rats based on 16S rRNA [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38 (7): 3098-3102.
- [3] BROWNE P D, BOLTE A, CLAASSEN E, et al. Probiotics in pregnancy: protocol of a double-blind randomized controlled pilot trial for pregnant women with depression and anxiety (PIP pilot trial) [J]. *Trials*, 2019, 20(1): 440.
- [4] 侯俊林, 杨丽萍, 李玉洁, 等. 孕期情志应激致胎损的机制及防治措施 [J]. *河南中医*, 2024, 44(2): 306-310.
HOU J L, YANG L P, LI Y J, et al. The mechanism and prevention and treatment of fetal injury caused by emotional stress during pregnancy [J]. *Henan Tradit Chin Med*, 2024, 44(2): 306-310.
- [5] 陈文璐, 闫晓如, 高继萍, 等. 肠道菌群在抑郁症发生中的调控机制研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(10): 130-135.
CHEN W L, YAN X R, GAO J P, et al. Research progress on the regulatory mechanism of intestinal flora in the occurrence of depression [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(10): 130-135.
- [6] SHUFFREY L C, SANIA A, BRITO N H, et al. Association of maternal depression and anxiety with toddler social-emotional and cognitive development in South Africa: a prospective cohort study [J]. *BMJ Open*, 2022, 12(4): e058135.
- [7] 吴永叶, 杨丽萍, 张振强, 等. 五行音乐对孕期恐应激子代社交行为的影响及机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(4): 28-34.
WU Y Y, YANG L P, ZHANG Z Q, et al. Effects and mechanism of five-element music on social behavior of offspring of stress-injured pregnant mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(4): 28-34.
- [8] WALZ N, MÜHLBERGER A, PAULI P. A human open field test reveals thigmotaxis related to agoraphobic fear [J]. *Biol Psychiatry*, 2016, 80(5): 390-397.
- [9] LI H Q, JIANG W, LING L, et al. Generalized fear after acute stress is caused by change in neuronal cotransmitter identity [J]. *Science*, 2024, 383(6688): 1252-1259.
- [10] HONG J Y, LIM J, CARVALHO F, et al. Long-term programming of CD8 T cell immunity by perinatal exposure to glucocorticoids [J]. *Cell*, 2020, 180(5): 847-861.
- [11] ENAYATI M, MOSAFERI B, HOMBERG J R, et al. Prenatal maternal stress alters depression-related symptoms in a strain-and sex-dependent manner in rodent offspring [J]. *Life Sci*, 2020, 251: 117597.
- [12] FANG M, LI Y, LIAO Z, et al. Lipopolysaccharide-binding protein expression is increased by stress and inhibits monoamine synthesis to promote depressive symptoms [J]. *Immunity*, 2023, 56(3): 620-634.
- [13] AALBERS S, FUSAR-POLI L, FREEMAN R E, et al. Music therapy for depression [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 11: CD004517.
- [14] 李懿, 曾莉, 何丽雯, 等. 不同风格音乐对 CUMS 抑郁大鼠行为的影响及机制研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(3): 384-391.

- LI Y, ZENG L, HE L W, et al. Effects of different style music on behavior in CUMS depression rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(3): 384–391.
- [15] 刘渊, 王平. 基于五脏相音理论运用中华五行音乐治疗失眠探讨 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2024, 30(2): 209–212.
- LIU Y, WANG P. Discussion of the application of Chinese five elements music in the treatment of insomnia based on five organ and sound correlation theory [J]. *J Basic Chin Med*, 2024, 30(2): 209–212.
- [16] 徐海燕, 张黎丹, 夏兴梅, 等. 五行音乐疗法对中晚期肿瘤患者负性心理及睡眠质量的影响 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(11): 954–956.
- XU H Y, ZHANG L D, XIA X M, et al. Effects of five elements music therapy on negative psychology and sleep quality in patients with middle and advanced tumor [J]. *J Tradit Chin Med*, 2019, 60(11): 954–956.
- [17] 刘丽, 丁懿, 王健, 等. “五音调神法”治疗轻中度肝郁脾虚型卒中后抑郁患者的临床疗效及其对肠道菌群和血清 5-羟色胺水平的影响研究 [J]. *中国全科医学*, 2021, 24(30): 3882–3887.
- LIU L, DING Y, WANG J, et al. Clinical, gut flora, and serum serotonin responses to Wuyintiaoshen therapy in patients with mild-to-moderate post-stroke depression and liver qi stagnation and spleen deficiency syndrome [J]. *Chin Gen Pract*, 2021, 24(30): 3882–3887.
- [18] SZALA-RYCAJ J, SZEWCZYK A, ZAGAJA M, et al. The influence of topinambur and inulin preventive supplementation on microbiota, anxious behavior, cognitive functions and neurogenesis in mice exposed to the chronic unpredictable mild stress [J]. *Nutrients*, 2023, 15(9): 2041.
- [19] 马锦倩, 范翩翩, 郑涛, 等. 孕妇肠道、阴道菌群和新生儿胎粪、胎皮脂菌群的相关性研究 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2024, 44(1): 50–63.
- MA J Q, FAN P P, ZHENG T, et al. Relationship among maternal gut, vaginal microbiota and microbiota in meconium and vernix caseosa in newborns [J]. *J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci*, 2024, 44(1): 50–63.
- [20] LIU Y, WU Z, CHENG L, et al. The role of the intestinal microbiota in the pathogenesis of host depression and mechanism of TPs relieving depression [J]. *Food Funct*, 2021, 12(17): 7651–7663.
- [21] HAO W Z, LI X J, ZHANG P W, et al. A review of antibiotics, depression, and the gut microbiome [J]. *Psychiatry Res*, 2020, 284: 112691.
- [22] ZHU H Z, LIANG Y D, MA Q Y, et al. Xiaoyaosan improves depressive-like behavior in rats with chronic immobilization stress through modulation of the gut microbiota [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108621.
- [23] GUO Y, CHEN X, GONG P, et al. Advances in the mechanisms of polysaccharides in alleviating depression and its complications [J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154566.
- [24] HAO W, WU J, YUAN N, et al. Xiaoyaosan improves antibiotic-induced depressive-like and anxiety-like behavior in mice through modulating the gut microbiota and regulating the NLRP3 inflammasome in the colon [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 619103.
- [25] LIN H, GUO Q, WEN Z, et al. The multiple effects of fecal microbiota transplantation on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) patients with anxiety and depression behaviors [J]. *Microb Cell Fact*, 2021, 20(1): 233.
- [26] WU M, TIAN T, MAO Q, et al. Associations between disordered gut microbiota and changes of neurotransmitters and short-chain fatty acids in depressed mice [J]. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1): 350.
- [27] XIE Z, HUANG J, SUN G, et al. Integrated multi-omics analysis reveals gut microbiota dysbiosis and systemic disturbance in major depressive disorder [J]. *Psychiatry Res*, 2024, 334: 115804.
- [28] JANSSEN H, KAHLES F, LIU D, et al. Monocytes re-enter the bone marrow during fasting and alter the host response to infection [J]. *Immunity*, 2023, 56(4): 783–796.

[收稿日期]2024-08-13