

## 基于多维组学探究逍遥散低极性部位对 CUMS 模型大鼠的抗抑郁作用

冯彦<sup>1,2</sup>, 孟美黛<sup>1,2</sup>, 冯建有<sup>1,2</sup>, 王鹏<sup>1,2</sup>, 闫艳<sup>1</sup>, 秦雪梅<sup>1</sup>, 高晓霞<sup>1\*</sup>

(1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西太原 030006; 2. 山西大学化学化工学院, 山西太原 030006)

**摘要:** 研究逍遥散低极性部位对抑郁模型大鼠干预作用, 从肠道菌群和代谢物角度探讨逍遥散低极性部位抗抑郁作用机制。所有动物实验均通过山西大学科学研究伦理审查委员会审查。采用慢性温和不可预见应激 (CUMS) 程序对大鼠进行造模, 以逍遥散低极性部位及阳性药 (文拉法辛) 为干预药物, 结合 16S rRNA 基因测序和 LC-MS 代谢组学分析方法, 探究逍遥散低极性部位对 CUMS 大鼠盲肠内容物肠道菌群和代谢物的影响, 并对肠道菌群与代谢物进行 Pearson 关联分析。结果显示, 逍遥散低极性部位显著改善 CUMS 大鼠的抑郁样行为; 回调 CUMS 大鼠海马源性神经营养因子 (BDNF) 水平。肠道微生物群分析显示: 逍遥散低极性部位给药可以增加 CUMS 模型大鼠微生物群的多样性, 显著回调 CUMS 模型大鼠肠道微生物中罗斯氏菌属 (*Rothia*)、普雷沃氏菌属 (*Prevotella*), 其主要与肠道炎症和短链脂肪酸的产生有关。代谢组学结果表明, 盲肠内容物中鉴定出与抑郁症相关的 20 种生物标志物, 逍遥散低极性部位干预后可回调 17 种, 涉及的通路为亚油酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、初级胆汁酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢。相关分析进一步表明, 逍遥散低极性部位调节的肠道菌群与盲肠内容物代谢产物之间存在很强的相关性。综上, 逍遥散低极性部位可能通过调节肠道菌群的组成及盲肠内容物的代谢物及通路发挥抗抑郁疗效, 该研究为后续探索逍遥散低极性部位抗抑郁机制提供创新思路和实验依据。

**关键词:** 逍遥散; 抑郁症; 肠道菌群; 16S rRNA 技术; 代谢组学; LC-MS

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)02-0305-10

## Antidepressant-like effects of the petroleum ether fraction of Xiaoyaosan in the CUMS rat model of depression

FENG Yan<sup>1,2</sup>, MENG Mei-dai<sup>1,2</sup>, FENG Jian-you<sup>1,2</sup>, WANG Peng<sup>1,2</sup>, YAN Yan<sup>1</sup>,  
QIN Xue-mei<sup>1</sup>, GAO Xiao-xia<sup>1\*</sup>

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the effect of the petroleum ether fraction of Xiaoyaosan (XY-A) in a rat depression model with consideration of an underlying mechanism based on gut microbiota and metabolomics. All procedures involving animal treatment were approved according to the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Shanxi University. A rat model was established using the chronic unpredictable mild stress (CUMS) procedure and XY-A and venlafaxine (positive control) were used as intervention drugs. Sequencing of the 16S rRNA gene combined with LC-MS metabolomics was used to investigate the effects of XY-A on gut microbiota and metabolites in CUMS-induced depression, and Pearson correlation analysis was carried out on gut microbiota

收稿日期: 2019-08-08; 修回日期: 2019-10-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473415); 山西省应用基础研究优秀青年基金会项目 (201701D211009); 山西省科技创新重点团队 (201605D131045-18); 山西省重点实验室 (201605D111004).

\*通讯作者 Tel: 86-351-7011501, E-mail: gaomiaoxia@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0542

and metabolites. The results showed that XY-A significantly improved the depression-like behavior of CUMS rats and restored the level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampus. Gut microbiota analysis revealed that XY-A can increase the diversity of microbial species in CUMS rats and significantly restored the relative abundance of intestinal *Rothia* [Prevotella], with effects on intestinal inflammation and the production of short-chain fatty acids. Cecal content metabolomics identified twenty biomarkers that were altered by depression, whereas administration of XY-A ameliorated the changes in seventeen metabolites, with the most strongly affected metabolic pathways being linoleic acid metabolism, taurine and hypotaurine metabolism, primary bile acid biosynthesis, and arginine and proline metabolism. Correlation analysis further showed that there was a strong relationship between the gut microbiota and the cecal content metabolites. In summary, XY-A may exert antidepressant effects by regulating the composition of the gut microbiota and the metabolites and pathways of the cecum. The results provide a reference for the potential molecular mechanism of antidepressant action of XY-A.

**Key words:** Xiaoyao powder; depression; gut microbiota; metabolomics; 16S rRNA gene sequencing; metabolite

抑郁症是世界范围内常见的疾病,其特征是快感缺乏,情绪低落和自杀率高<sup>[1]</sup>。世界卫生组织(WTO)认为抑郁症是社会上最沉重的负担,它们可能成为全世界残疾的主要来源<sup>[2]</sup>。同时,抑郁症的发病机制非常复杂,一般认为其发病与遗传、生化、神经内分泌、免疫和心理社会环境等因素有关<sup>[3]</sup>,但至今也没有清楚统一的认识。近年来,肠道菌群与疾病关系的相关研究发现,为抑郁症的治疗带来新的视野<sup>[4]</sup>。动物实验显示,肠道菌群改变可通过炎症反应、下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamus-pituitary-adrenal axis, HPA)或神经递质的信号传递改变中枢神经系统生化特性,以诱发焦虑行为<sup>[5]</sup>。Jiang等<sup>[6]</sup>分析了抑郁症和健康人群肠道菌群结构,结果表明,抑郁症患者与健康人群肠道菌群结构存在显著差异。因此,通过调节肠道菌群改善抑郁可能成为今后抑郁症治疗的新趋势。

逍遥散方出自《太平惠民和剂局方》,是疏肝解郁、调和肝脾的代表方剂,是治疗抑郁症最常用的经典名方之一,临床及实验研究均显示该方有确切的抗抑郁作用<sup>[7]</sup>。并且课题组前期对逍遥散抗抑郁有效组分进行药理学研究,确定了低极性组分为其发挥药效的有效组分<sup>[8]</sup>。然而,逍遥散低极性部位作用下,对宿主肠道微生物群及其对代谢表型的影响仍然未知,并且将成为解释抑郁症可能机制的焦点。

随着高通量测序技术的发展,16S rRNA基因测序技术在细菌的鉴定与分类研究中发挥着越来越重要的作用。16S rRNA基因测序具有测序序列长、测序通量高、实验操作简单、结果稳定、可重复性强、测序数据便于进行生物信息分析等优越性,已成为微生物鉴定和分类的重要手段<sup>[9]</sup>。代谢组学是一种定量测定生命体系在受到病理生理学刺激时代谢物变化的技术,可全面反映代谢物质在疾病发生、发展过程中的变化规律,有利于揭示疾病的致病机制,筛选疾病的生物标志

物<sup>[10]</sup>。LC-MS技术选择性高、检测范围宽、灵敏度高,逐渐以高选择性、高分辨率和分析速度快等优点成为寻找病理生理代谢标志物的常用手段<sup>[11]</sup>。宏基因组和代谢组学相结合可广泛应用于对不同疾病肠道菌群组成及其代谢物质动态监控,以期寻找特定疾病的特有肠道菌群变化及代谢变化规律。研究者发现:把自闭症儿童的粪菌移植给无菌小鼠后,定植自闭症儿童的无菌小鼠后代与定植正常发育儿童菌群的无菌小鼠后代产生完全不同的代谢谱—特别是氨基酸代谢<sup>[12]</sup>。将正常人体0级及脂肪肝变性3级患者的粪便分别移植至小鼠体内,发现移植脂肪肝变性患者的菌群小鼠肝脏甘油三酯含量、Fabp4(脂肪酸结合蛋白)表达及血浆中缬氨酸水平均增加,说明菌群移植对小鼠代谢表型有显著影响<sup>[13]</sup>。

本研究通过16S rRNA基因测序结合基于LC-MS的代谢组学探究逍遥散低极性部位对抑郁模型大鼠盲肠内容物肠道菌群及代谢产物的影响。旨在发现与逍遥散低极性部位抗抑郁相关的潜在代谢标志物和菌群,为抗抑郁机制及抗抑郁药物研究提供实验依据。

## 材料与方法

**动物** 所有动物实验均通过山西大学科学研究伦理审查委员会审查(SXULL2014032)。成年雄性SD大鼠,体质量(180±20)g,24只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0011。所有动物在清洁环境下饲养,自由饮食和饮水,饲养温度为(22±2)℃,相对湿度为(50±10)%,12h的光照/黑暗周期。

**药品与试剂** 逍遥散组方中柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、炙甘草、薄荷和干姜等药材饮片均购于山西省华阳药业有限公司,所有药材经山西大学中医药现代研究中心生药学秦雪梅教授鉴定为正品。

石油醚购自天津市天力化学试剂有限公司,乙醇购自天津市致远化学试剂有限公司,所有其他化学品和试剂均为分析级。

**仪器** Dionex UltiMate 3000 超高效液相色谱及四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪、Xcalibur 工作站(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);电子分析天平 BS210S(南京莱步科技实业有限公司);Scientz-12N 真空冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司);旋转蒸发器(德国艾卡集团);大鼠旷场测试(长100 cm、宽100 cm、高80 cm),黑色,25格,实验室自制;Illumina 高通量测序平台;酶标仪(Thermo Scientific Microplate Reader)。

**逍遥散低极性部位制备** 按逍遥散复方配比(柴胡-白芍-当归-白术-茯苓-甘草-薄荷-干姜,6:6:6:6:6:3:2:2)取适量药材,混匀,加8倍量95%乙醇,加热回流2次,每次2 h,合并回流液,过滤,回收乙醇至无醇味,然后加入等体积的石油醚超声萃取(30 min/次),至萃取液近乎无色。合并石油醚提取液,回收溶剂,浓缩至浸膏,于真空干燥箱(60 °C)中干燥,即得。取浸膏适量,用0.5%羧甲基纤维素钠-0.5%聚山梨酯-80水溶液溶解,制成浓度为1.278 mg·mL<sup>-1</sup>的灌胃液。

**动物分组及给药** SD大鼠24只,随机分成4组( $n=6$ ),即正常组(K)、CUMS模型组(M)、逍遥散低极性给药组(S, 92.6 g·kg<sup>-1</sup>)、阳性药文拉法辛组(Y, 35 mg·kg<sup>-1</sup>)。各给药组灌胃给予相应药物,正常组和模型组给予等剂量生理盐水,10 mL·kg<sup>-1</sup>,每天1次,连续给药28天,造模同时给药。

**CUMS抑郁模型复制** 根据本实验室前期实验的经验<sup>[14]</sup>,以慢性不可预见性的温和刺激,配合孤养。9种应激因子按随机方法在28天内应用:①禁食24 h;②禁水24 h;③4 °C冰水浴5 min;④超声刺激3 h(功率60 W);⑤45 °C热刺激10 min;⑥足底电击5 min(电压36 V);⑦昼夜颠倒;⑧夹尾2 min;⑨束缚3 h。每日给予一种刺激,每种刺激累计使用2或3次,顺序随机,使动物不能预料刺激的发生。

#### 行为学实验观察

**旷场实验** 水平穿越格数以穿越底面方格数为其水平得分,穿越1格为1分;直立次数以两前腿离地或爬墙壁计次数。

**糖水消耗实验** 糖水偏爱率 = 糖水消耗量/总液体消耗量×100%。

**大鼠体重改变** 称量各组大鼠的体重,并观测大鼠体重改变情况。

**样品的收集及生化分析** 第28天末次给药1 h后,用10%水合氯醛(5 mL·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉大鼠

后腹主动脉取血,放置30 min后,3 500 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,取上清液;在冰上快速解剖海马,在液氮中快速冷冻,并在-80 °C储存用于生化分析。分离大鼠盲肠样品并立即在-80 °C冷冻,用于16S rRNA基因测序及代谢组学分析。

取大鼠海马组织30 mg,加入4 °C的PBS缓冲液300 μL,使用高通量组织研磨仪(DHFSTPRP-24)匀浆,并在4 °C下以13 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,提取上清液,检测脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)的含量。实验步骤严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作。

**16S rRNA基因测序** 参照文献<sup>[15]</sup>,从大鼠盲肠样品中分离冷冻微生物DNA,并通过0.8%琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量,同时采用紫外分光光度计对DNA进行定量。使用正向引物5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'和反向引物5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'扩增微生物群落16S rRNA基因的V3和V4区。PCR扩增采用NEB公司的Q5高保真DNA聚合酶,并严格控制扩增循环数,使循环数尽可能低的同时,也保证同一批样本的扩增条件一致。PCR扩增产物通过2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并对目标片段进行切胶回收。参照电泳初步定量结果,将PCR扩增回收产物进行荧光定量,根据荧光定量结果,按照每个样本的测序量需求,对各样本按相应比例进行混合。利用Illumina MiSeq平台进行16S rRNA基因测序。采用Mothur软件,通过Metastats统计分析,对门和属水平的各个样本(组)之间分类单元序列量(即绝对丰度)差异进行两两两两比较检验。

#### LC-MS代谢组学分析

**盲肠内容物样品的制备** 从-80 °C冰箱取出盲肠内容物样本,于4 °C下解冻,分别取出1 g置于5 mL EP管,加入乙腈3 mL,涡旋2 min,在4 °C下以13 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清液待进样分析。另各取上述6组盲肠内容物样本10 μL,混合,按样品备样方法制备,作QC样本。

**LC-MS分析液相条件** 流动相:A(水,含0.1%甲酸),B(乙腈,含0.1%甲酸);流动相梯度:0~2 min,2% B;2~3 min,2%~35% B;3~17 min,35%~70% B;17~18 min,70% B;18~29 min,70%~98% B;29~31 min,98% B;31~33 min,98%~2% B;33~35 min,2% B。流速:0.2 mL·min<sup>-1</sup>,进样量:5 μL,柱温:40 °C,Waters Acquityuplc HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm)。

**LC-MS分析质谱条件** 采用ESI电喷雾离子化方式;以正负离子切换采集模式,扫描模式:full scan/dd-MS<sup>2</sup>,

$m/z$  采集范围为 100~1 500。喷雾电压正极为 3.5 kV; 负极为 2.5 kV。毛细管温度为 320 °C; 加热器温度 300 °C; 鞘气流速: 35 arb, 辅助气流速: 10 arb; 分辨率设定为 MS full scan 35000 FWHM 以及 MS/MS 17500 FWHM, NCE 设定为 12.5、25 和 37.5 eV。

**LC-MS 数据处理** 将采集所得的 LC-MS/MS 数据原始文件导入 Compound Discoverer 3.0 软件 (美国 Thermo Fisher 公司), 以获取匹配和对齐的峰值数据, 设置参数如下: 质量范围 100~1 500, 质量偏差  $5 \times 10^{-6}$ ; 保留时间偏差 0.05 min; 信噪比阈值 1.5。将峰面积归一化后的数据导入 SIMCA-P 13.0 (Umetrics 公司, 瑞典) 进行偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。结合 S-plot 图中的 VIP>1 和独立样本  $t$  检验的  $P < 0.05$  筛选贡献最大的差异性变量。通过 HMDB 数据库并结合二级碎片离子对差异性变量进行鉴定指认, 通过 Metabo Analyst 3.0 进行通路富集分析并利用 KEGG 在线数据库以及相关文献报道对差异代谢物所涉及的相关代谢通路进行分析。

**统计学分析** 使用 SPSS 16.0 和 GraphPad Prism 6 进行统计分析和图表绘制, 采用单因素方差分析和  $t$  检验进行差异比较。  $P < 0.05$  表明具有显著性差异。

## 结果

### 1 行为学

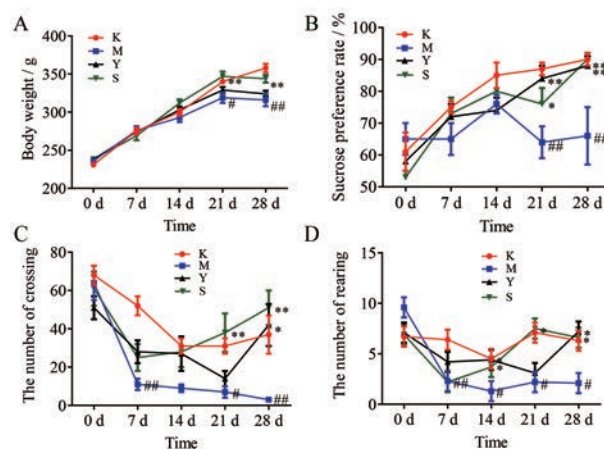
**1.1 体重** 实验开始时, 各组大鼠的体重均没有显著差异。实验第 28 天, 与正常组大鼠相比, 模型组大鼠体重明显减少 ( $P < 0.01$ )。给予逍遥散低极性部位及文拉法辛后, 与模型组相比, 逍遥散低极性部位显著增加了大鼠体重 ( $P < 0.01$ ), 阳性药无统计学差异, 表明逍遥散低极性部位可改善 CUMS 大鼠的生长迟缓。结果如图 1A。

**1.2 糖水偏爱率** 实验开始时, 各组大鼠的糖水偏爱率均无显著性差异。实验第 28 天, 模型组大鼠糖水偏爱率较正常组大鼠显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而在给予逍遥散低极性部位及文拉法辛后, 大鼠的糖水偏爱率显著升高 ( $P < 0.01$ ), 表明逍遥散低极性部位能改善应激造成的快感缺失。结果如图 1B。

**1.3 穿越格数** 实验开始时, 各组大鼠均无显著性差异。实验第 28 天, 抑郁大鼠在中央区穿越次数较正常组显著性降低 ( $P < 0.01$ ), 而这种差异能被逍遥散低极性部位及文拉法辛显著逆转 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。结果如图 1C。

**1.4 直立次数** 实验开始时, 各组大鼠均无显著性差异。实验第 28 天, 与正常组大鼠相比, 模型组大鼠直立次数显著降低 ( $P < 0.05$ )。给予逍遥散低极性部位及

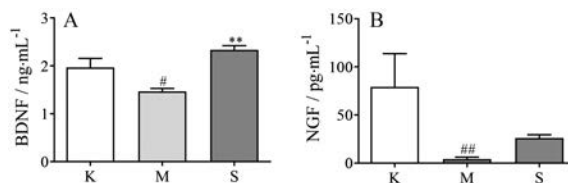
文拉法辛后, 与模型组相比, 大鼠的直立次数显著性增加 ( $P < 0.05$ )。结果如图 1D。



**Figure 1** Effect of the petroleum ether fraction of Xiaoyaosan (XY-A) on weight and behavior of chronic mild unpredictable stress (CUMS) rats. A: Body weight; B: Sugar water preference; C: The number of crossing; D: The number of rearing. K: Normal groups; M: Model groups; Y: Positive drug (venlafaxine) groups; S: Petroleum ether fraction of Xiaoyaosan groups.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs M; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs K

### 2 海马神经因子变化

BDNF 和 NGF 是神经因子家族的两个成员, 在神经系统的生长发育中有重要作用<sup>[6]</sup>。与空白组相比, 4 周应激程序导致 CUMS 大鼠海马中 BDNF、NGF 水平显著降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。然而, 与 CUMS 模型组相比, 逍遥散低极性部位给药显著升高海马 BDNF 水平 ( $P < 0.01$ ), 对海马 NGF 水平没有显著影响 (图 2A, 2B)。



**Figure 2** Neurotrophic factor levels in the hippocampus. A: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels; B: Nerve growth factor (NGF) levels.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs M; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs K

### 3 逍遥散低极性部位调节 CUMS 大鼠的肠道微生物组成

**3.1 菌群多样性分析** 在 Shannon 稀疏图表中, 每个样本的曲线趋于平滑, 表明测序深度足以反映当前样本所包含的多样性 (图 3A)。与 K 组相比, M 组 Shannon 指数显著降低 ( $P < 0.05$ ), 表明模型组多样性降低。逍遥散低极性部位给药后, S 组菌群多样性高于 M 组, 说

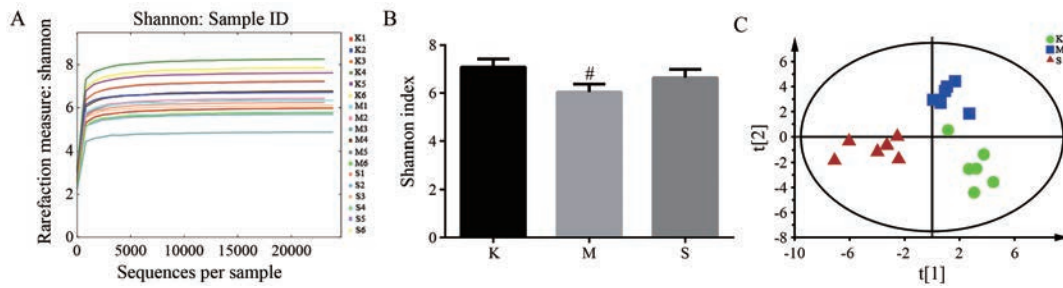


Figure 3 Shannon sparse curve (A), alpha diversity index (B) and PLS-DA analysis (C).  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$  vs K

明逍遥散低极性部位可以增加菌群多样性(图3B)。PLS-DA结果显示,K组和M组之间明显分离,表明两组菌群结构具有明显差异。逍遥散低极性部位给药后S组在纵坐标方向与模型组分离,表明S组显著调节模型组的肠道微生物(图3C)。

**3.2 菌群组成分析** 在门水平(图4A),最主要的微生物类群是厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria),其中厚壁菌门相对丰度超过90%。然而不同组之间存在一些差异(图5A和5B)。与K组相比,M组拟杆菌门丰度显著增加( $P < 0.05$ ),给予逍遥散低极性部位后,S组拟杆菌门(Bacte-

roidetes)的丰度降低。拟杆菌门/厚壁菌门(Bacteroidetes/Firmicutes, B/F)的比值已被认为是人类健康标志之一<sup>[17]</sup>,与K组相比,M组中观察到拟杆菌/厚壁菌比例显著增加,逍遥散低极性部位给药回调了这个比例,有利于人类健康。

在属水平(图4B),主要的菌属有乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、阿克曼菌属(*Akkermansia*)和别样棒杆菌属(*Allobaculum*)。其中与K组相比,M组罗斯氏菌属(*Rothia*)和毛形杆菌属(*Lachnobacterium*)丰度显著降低,苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、普雷沃氏菌属(*[Prevotella]*)、贪铜菌属(*Cupriavidus*)和别样棒杆菌属丰

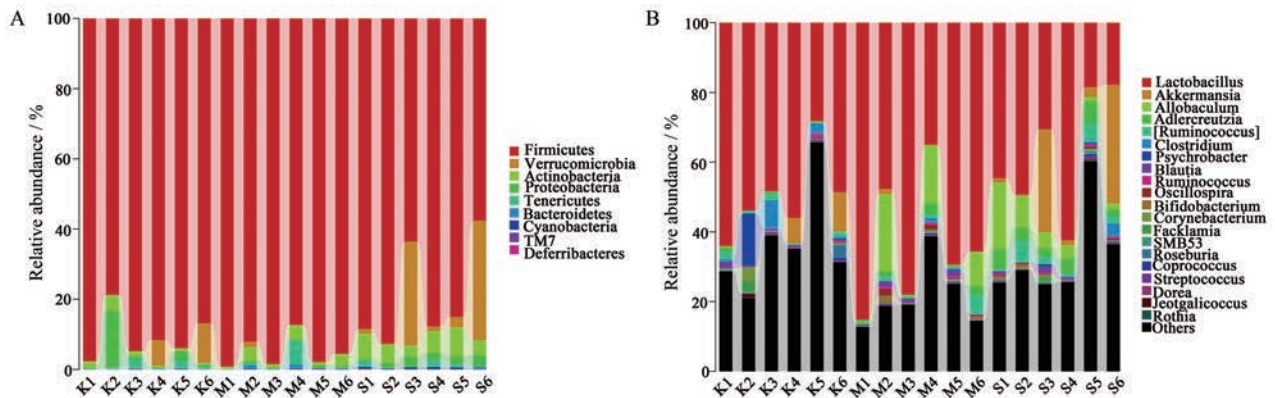


Figure 4 Classification and abundance of cecal contents of the phylum (A) and the genus (B)

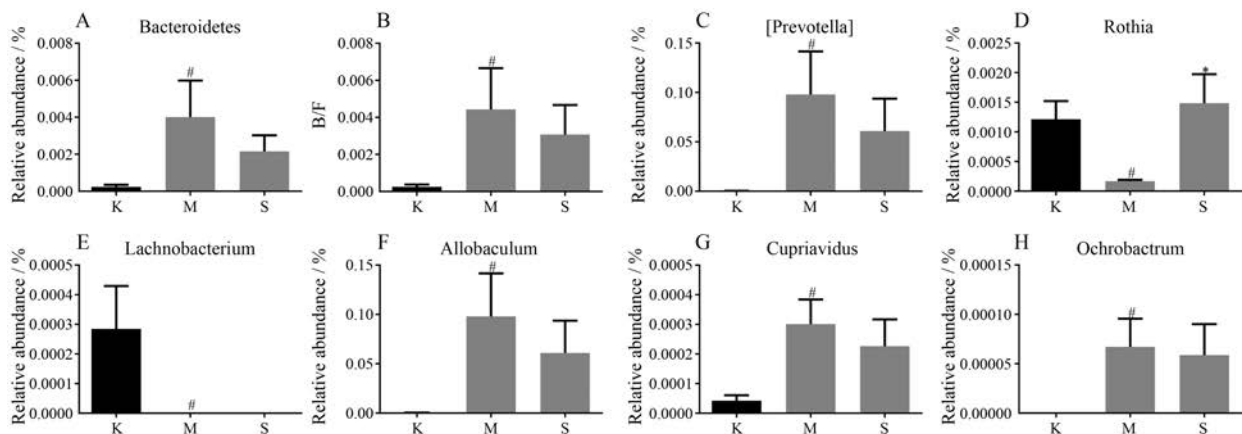


Figure 5 Relative abundance of selected phylum with significant differences among each group (A-B); Relative abundance of selected genera with significant differences among each group (C-H). B/F: Bacteroidetes/Firmicutes.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$  vs M; # $P < 0.05$  vs K

度显著升高。逍遥散低极性部位给药后,可回调这5个菌属,其中普雷沃氏菌属与罗斯氏菌属能显著回调( $P<0.05$ ) (图5C~5H)。总之,逍遥散低极性部位干预可以调节抑郁模型大鼠的肠道微生物群。

#### 4 LC-MS代谢组学

**4.1 仪器系统稳定性监测** 在批量样本进样分析过程中,每随机进6针样品进一针QC,以监测LC-MS稳定性。结果显示(图6A),从PCA得分图可以看到,QC样品聚集在一起,说明代谢组学检测平台的稳定性和可靠性。此外,从每个QC样品分别提取10个离子,分别计算10个离子的保留时间( $t_R$ )和质荷比( $m/z$ )的RSD值,用来监督LC-MS系统的稳定性。10个提取离子 $t_R$ 的RSD为0.146%~0.521%, $m/z$ 的RSD为 $4.08\times 10^{-7}$ ~ $1.36\times 10^{-6}$ ,相对峰面积的RSD为1.46%~8.85%(表1)。这些结果表明本研究所建立的分析方法的重复性和稳定性符合大批量盲肠内容物样本代谢组学的分析要求。

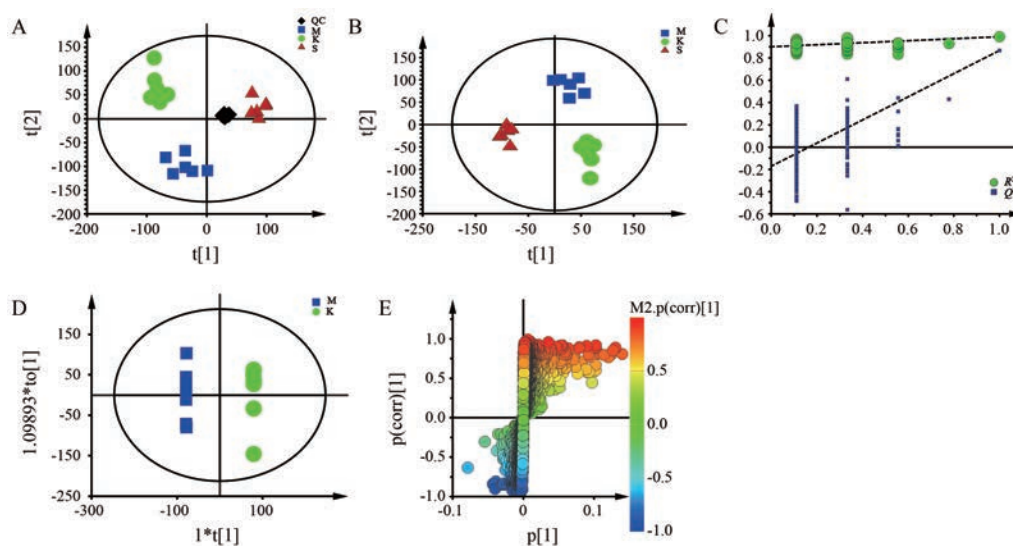
**4.2 盲肠内容物代谢分析** 通过LC-MS获得各组大

鼠盲肠内容物的代谢谱。采用PLS-DA对各组样本数据进行主成分分析。由PLS-DA得分图可看出(图6B),抑郁模型组和正常组明显分离,表明CUMS诱导的盲肠内容物的显著变化;给药组与模型组明显分离并趋于正常,逍遥散低极性部位给药恢复CUMS诱导的盲肠内容物的改变。为了验证模型可靠性,对以上数据模型数据进行排列实验( $n=200$ ),结果表明(图6C), $R^2$ 与 $Q^2$ 参数接近,模型斜率大且与纵轴截距为负值,这两种模型未产生过分拟合,而是反映了所产生的代谢变化,表明模型可靠。

**4.3 盲肠内容物差异代谢物** 为了寻找与抑郁症相关的潜在生物标志物,对模型组和正常组数据进行OPLS-DA分析,以筛选与抑郁相关的内源性差异物。OPLS-DA得分显示模型组和正常组显著分离(图6D),表明抑郁症盲肠内容物代谢轮廓发生显著改变。并结合S-Plot图(图6E)中的VIP>1和独立样本 $t$ 检验的 $P<0.05$ 筛选贡献最大的差异性变量。借助HMDB数据库及NCBI数据库对差异变量进行鉴定指认;共指认

**Table 1** The stability of UHPLC-MS method using QC sample

No.	$t_R$ /min	RSD (%) of $t_R$	$m/z$	RSD (%) of $m/z$	RSD (%) of relative peak areas	Ion
1	1.14	0.146 0	146.165 2	$8.16\times 10^{-5}$	4.49	M+H
2	4.64	0.251 0	252.109 1	$6.32\times 10^{-5}$	3.00	M+H
3	5.67	0.182 3	166.086 2	$4.08\times 10^{-5}$	3.29	M+H
4	9.54	0.407 5	297.113 2	$4.08\times 10^{-5}$	4.68	M-H
5	12.77	0.521 1	357.278 6	$1.36\times 10^{-4}$	3.13	M+H
6	16.39	0.504 0	785.592 4	$3.43\times 10^{-5}$	1.46	M+H
7	19.11	0.393 6	436.283 7	$9.83\times 10^{-5}$	3.16	M-H
8	25.22	0.208 9	256.263 4	$1.04\times 10^{-4}$	3.40	M+H
9	26.31	0.193 2	403.158 4	$8.16\times 10^{-5}$	5.46	M-H
10	29.35	0.145 9	310.310 2	$8.36\times 10^{-5}$	8.85	M+H



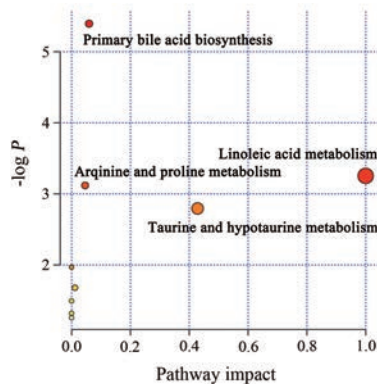
**Figure 6** PCA scores plot of rat cecal contents from control group, model group, S group and QC ( $n=6$ ,  $R^2X=0.53$ ,  $R^2Y=0.998$ ,  $Q^2=0.902$ ) (A); PLS-DA scores plots of rat cecal contents from control group, model group, and S group ( $n=6$ ,  $R^2X=0.519$ ,  $R^2Y=0.999$ ,  $Q^2=0.886$ ) (B); permutation test from PLS-DA ( $R^2=0.946$ ,  $Q^2=-0.13$ ) (C); OPLS-DA scores plots of rat cecal contents from control group and model group ( $n=6$ ,  $R^2X=0.568$ ,  $R^2Y=1$ ,  $Q^2=0.797$ ) (D); S-plot from OPLS-DA (E)

**Table 2** Identified differential metabolites in the cecal contents of CUMS rats with or without administration of XY-A. ↑ and ↓ represent higher and lower level; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs M; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs K

No.	Metabolite	$t_R$ /min	$m/z$	Ion	VIP	HMDB ID	M/K	S/M
1	Spermidine	1.144	146.165 1	M+H	6.073 6	01 257	↑ #	↓ *
2	Taurine	1.369	126.022 0	M+H	4.480 3	00 251	↓ ##	↑ *
3	Creatine	1.677	132.102 1	M+H	2.965 8	00 064	↓ #	↑ *
4	Citric acid	2.618	191.018 6	M-H	1.256 1	00 094	↓ ##	↑
5	2'-Deoxyadenosine	4.646	252.109 1	M+H	1.855 2	00 101	↓ ##	↑
6	Kynurenic acid	7.81	190.049 9	M+H	1.464 3	00 715	↓ #	↑ *
7	Taurocholic acid	7.921	514.283 2	M-H	12.144	00 036	↓ #	↑
8	1beta-Hydroxycholic acid	8.07	409.294 8	M+H	1.117 2	00 433	↓ ##	
9	Benzoic acid	9.344	123.044 2	M+H	1.304 9	01 870	↓ ##	↑ **
10	Taurochenodeoxycholic acid	12.044	498.288 3	M-H	7.913 6	00 036	↓ #	↑ **
11	Cholic acid	14.363	409.294 8	M+H	1.117 2	00 619	↓ ##	↑ *
12	Coprocholic acid	14.599	449.326 1	M-H	2.173 7	03 533	↓ ##	
13	Palmitoylcarnitine	17.592	400.342 1	M+H	1.703 7	00 222	↓ ##	↑ *
14	Stearoylcarnitine	20.013	428.373 4	M+H	2.834 5	00 848	↓ ##	↑ *
15	LPE (18:0/0:0)	21.092	480.308 4	M-H	3.992 5	11 130	↓ #	
16	Oleic acid	21.453	283.262 2	M+H	4.295 5	00 207	↓ ##	↑
17	Enoxolone	22.412	469.331 2	M-H	2.515 7	11 628	↑ ##	↑ *
18	linoleic acid	22.51	281.247 1	M+H	2.028 1	00 673	↓ ##	↑ *
19	Deoxycholic acid	23.234	393.299 9	M+H	5.303 4	00 626	↓ ##	↑
20	Stearamide	29.451	284.294 8	M+H	4.196 6	34 146	↓ #	↑ *

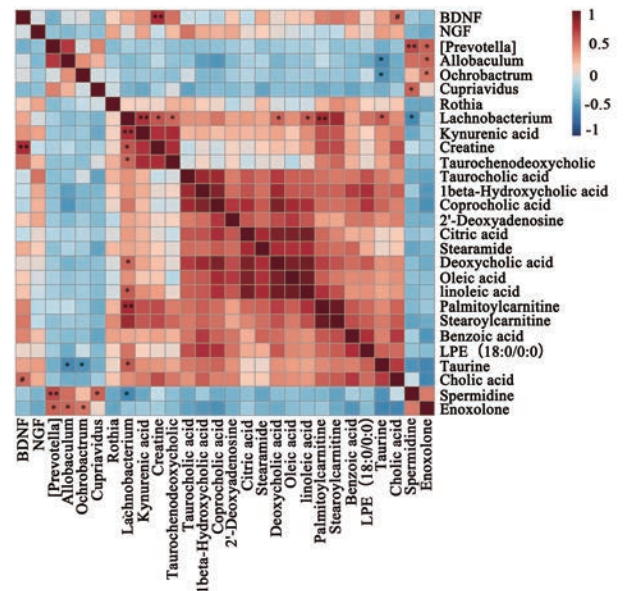
出20个与抑郁相关的差异代谢物, 逍遥散低极性部位干预后可回调17个代谢物, 其中显著回调12个(表2)。表明逍遥散低极性部位对抑郁模型大鼠的盲肠内容物代谢轮廓具有一定的调控作用。

**4.4 差异代谢物通路分析** 采用Metabo Analyst对差异代谢物所涉及代谢通路进行富集分析。如图7, 横坐标Pathway impact表示由拓扑分析所计算出的代谢通路重要性值, 纵坐标 $-\log P$ 表示代谢通路富集分析的显著性水平。本研究将impact value $>0.1$ 以及 $-\log P > 4$ 的代谢通路视为贡献最大的代谢途径。主要包括: ① 亚油酸代谢 (linoleic acid metabolism); ② 初级胆汁酸生物合成 (primary bile acid biosynthesis); ③ 牛磺酸和亚牛磺酸代谢 (taurine and hypotaurine metabolism); ④ 精氨酸和脯氨酸代谢 (arginine and proline metabolism)。

**Figure 7** Pathway analyses of metabolites. Each point represents one metabolic pathway; the size of dot and shades of color are positively correlated with the impact on the metabolic pathway

## 5 相关性分析

为了探索海马神经营养因子、肠道微生物及代谢物之间的功能相关性, 通过计算Pearson相关系数生成相关矩阵。系数表明, 它们之间存在强烈的相关性 ( $r > 0.5$  或  $r < -0.5$ ,  $P < 0.05$ ) (图8)。可以发现, BDNF与胆酸 (cholic acid)、肌酸 (creatine) 显著正相关; 普雷沃氏菌属与亚精胺 (spermidine)、18 $\beta$ -甘草次酸 (enoxolone) 显著正相关; 别样棒菌属, 苍白杆菌属均与18 $\beta$ -

**Figure 8** Heat map summarizing the Pearson's correlation between neurotrophic factor, gut microbiota and metabolites. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (gut microbiota vs metabolites); # $P < 0.05$  (neurotrophic factor vs metabolites)

甘草次酸显著正相关,与牛磺酸 (taurine) 显著负相关; 舍铜菌属与亚精胺显著正相关; 毛形杆菌属与犬尿酸 (kynurenic acid)、肌酸、牛磺鹅去氧胆酸 (taurochenodeoxycholic acid)、脱氧胆酸 (deoxycholic acid)、亚油酸 (linoleic)、棕榈酰肉碱 (palmitoylcarnitine)、牛磺酸显著正相关,与亚精胺显著负相关。这些发现证实,肠道微生物群在逍遥散低极性部位介导的盲肠内容物代谢组变化中起着至关重要的作用。

## 讨论

本研究采用 16S rRNA 基因测序结合 LC-MS 的代谢组学分析评估逍遥散低极性部位对抑郁模型大鼠肠道微生物菌群和代谢表型的影响。结果表明,逍遥散低极性部位给药恢复了 CUMS 诱导的肠道微生物群紊乱;同时,还改变了异常的盲肠内容物代谢。此外,肠道微生物与代谢物存在显著关联。这些发现可能提供关于逍遥散低极性部位抗抑郁机制的新见解。

课题组前期对逍遥散抗抑郁有效部位的化学成分进行了研究,运用多种色谱方法对其中大部分的化学成分进行系列研究发现<sup>[18]</sup>,低极性部位共鉴定出 39 个主要化学成分,主要包括甾体类、黄酮类、三萜类、有机酸类、鞣质类、挥发油类化合物。另外,课题组将采用 LC-MS 法对其中复杂的成分进一步分析指认,在以后工作中仍然需要再结合其他技术手段对其化学成分进行更全面、准确的指认分析,为进一步研究更多的抗抑郁活性成分提供坚实的基础。

现有大量证据表明抑郁症患者体内存在一个慢性低度的炎症反应,伴随着血液和脑脊液中炎症生物标志物和前炎症因子水平的升高<sup>[19,20]</sup>。而普雷沃氏菌属与炎症疾病的发生发展密切相关。Gao 等<sup>[21]</sup>研究黄芩素对 SAMP8 小鼠快速老化小鼠皮质促炎细胞因子和肠道菌群的影响,发现普雷沃氏菌属与炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 的水平呈正相关。Dziarski 等<sup>[22]</sup>发现在葡聚糖硫酸钠盐 (DSS) 诱导的结肠炎小鼠模型中,普雷沃氏菌属的丰度显著升高。由此推测,普雷沃氏菌属可能对抑郁症患者的炎症系统起一定调节作用,逍遥散低极性部位给药显著降低了普雷沃氏菌属的丰度,其可能通过调节肠道炎症,减轻炎症反应,从而达到抗抑郁效果。

罗斯氏菌属微弯杆, 0.5  $\mu\text{m}$  × 2.3 ~ 5.0  $\mu\text{m}$ , 不产芽孢, 发酵几种碳水化合物, 主要产生或只产生丁酸<sup>[23]</sup>。丁酸作为短链脂肪酸的一种, 在神经系统疾病中通常发挥着有益作用。Wang 等<sup>[24]</sup>发现丁酸可通过抗炎和抗氧化作用减轻败血性心脏病的抑郁。Chen 等<sup>[25]</sup>发现丁酸盐可通过改变神经元线粒体功能并改善抑郁症状。本研究发现逍遥散低极性部位能显著升高罗斯氏

菌属的丰度,其可能通过调节产生短链脂肪酸的肠道微生物群的丰度发挥其抗抑郁活性。

$\omega$ -6 多不饱和脂肪酸 (亚油酸) 是神经、内分泌和免疫系统的递质,可改变神经膜的流动相,影响神经递质的合成功能<sup>[26]</sup>。之前研究抑郁发作患者和匹配的健康对照组患者血浆  $\omega$ -6 脂肪酸水平,发现研究组血浆  $\omega$ -6 脂肪酸水平显著低于对照组<sup>[27]</sup>。本研究发现逍遥散低极性部位能升高亚油酸的含量,推测逍遥散低极性部位对神经细胞的发育和神经细胞兴奋的传导具有保护作用。

胆汁酸是肝细胞内胆固醇的转化产物,主要存在于肝肠循环系统并通过再循环起一定的保护作用<sup>[28]</sup>。胆汁酸随胆汁进入肠道后,99% 被肠壁重吸收,经门静脉重回肝脏,当肝细胞受损时,由于摄取“肝肠循环”回收胆汁酸向肠道排泄的能力下降,导致肠道胆汁酸浓度下降<sup>[11]</sup>。在本实验中,与正常组比较,胆酸水平在模型组中显著降低,推测是由于肝损伤引起。提示逍遥散低极性部位可通过保护受损肝细胞发挥调节肠道胆汁酸平衡作用。

差异代谢物肌酸和亚精胺是涉及精氨酸和脯氨酸代谢通路的关键代谢产物。肌酸是一种天然存在的有机酸,可作为能量缓冲剂和能量载体在组织 (如大脑和骨骼肌) 中提供动态能量需求<sup>[29]</sup>。越来越多的证据表明,抑郁症的发生和维持与大脑能量产生、储存和利用的中断有关<sup>[30]</sup>。在本实验中,给药组肌酐显著上调,提示逍遥散低极性部位可能通过改善大脑能量代谢异常发挥作用。亚精胺是一种具有生物活性的低分子脂肪族含氨基的多胺类化合物,普遍存在于组织细胞中。研究发现,亚精胺通过阻断小胶质细胞中的 NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt 和 MAPKs 信号通路来抑制 LPS 刺激的炎症<sup>[31]</sup>。Jeong 等<sup>[32]</sup>发现亚精胺能显著抑制巨噬细胞中前炎症介质 NO、PGE2 和炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的表达。研究发现, CUMS 大鼠盲肠内容物中亚精胺的含量显著升高,异常升高的亚精胺水平,可能反映了机体的一种自我防御机制。逍遥散低极性部位给药后显著降低亚精胺水平,提示可能通过调节炎症反应产生抗抑郁作用。

牛磺酸是一种条件氨基酸,在大脑发育过程中有神经营养因子和神经保护的作用<sup>[33]</sup>。Yuan 等<sup>[34]</sup>研究牛磺酸抑郁症模型小鼠的干预作用,发现牛磺酸显著缩短了行为绝望模型小鼠的不动时间和强迫游泳的不动时间,显著升高了 5-羟色胺、去甲肾上腺素和多巴胺水平,升高脑源性神经营养因子水平,具有显著的抗抑郁作用。本研究发现逍遥散低极性部位能升高牛磺酸的含量,可以推测逍遥散低极性部位抗抑郁作用与神

经单胺递质和脑源性神经营养因子有关。

总之, 本研究采用 16S rRNA 基因测序结合基于 LC-MS 的代谢组学探究逍遥散低极性部位对抑郁模型大鼠盲肠内容物肠道菌群及代谢物的影响, 16S rRNA 基因测序分析显示, 逍遥散低极性部位显著回调罗斯氏菌属、普雷沃氏菌属, 其主要参与短链脂肪酸的产生和肠道炎症; 盲肠内容物代谢组学分析显示, 逍遥散低极性部位回调了 20 种差异代谢物中的 17 种, 主要涉及亚油酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、初级胆汁酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢。同时, 相关分析显示盲肠内容物差异菌群与代谢物显著关联。因此, 本研究初步证实逍遥散低极性部位可能通过调节紊乱的肠道菌群和宿主代谢发挥抗抑郁疗效, 同时未来的工作应证实微生物与代谢物之间存在因果关系。

## References

- [1] Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, et al. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys [J]. *Lancet*, 2007, 370: 851-858.
- [2] Yu M, Jia H, Zhou C, et al. Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 138: 231-239.
- [3] Mu L, Sun JX. Regulation mechanism of depression and antidepressant drug targets [J]. *J Int Pharm Res (国际药理学研究杂志)*, 2015, 42: 463-466.
- [4] Yu M, Jia H, Zhou C, et al. Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 138: 231-239.
- [5] Wang Y, Kasper LH. The role of microbiome in central nervous system disorders [J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 38: 1-12.
- [6] Jiang HY. Diversity of Gut Microbiota Associated with Patients with Major Depressive Disorder (人类肠道微生物群落菌群多样性变化与抑郁症的相关性研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [7] Ding XF, Liu Y, Yan ZY, et al. Involvement of normalized glial fibrillary acidic protein expression in the hippocampi in antidepressant-like effects of Xiaoyaosan on chronically stressed mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 1-13.
- [8] Zhou Y, Lu L, Li Z, et al. Antidepressant-like effects of the fractions of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137: 236-244.
- [9] Li DP, Guo MZ, Xu WT. Advances and applications on methodology of 16S rRNA sequencing in gut microbiota analysis [J]. *Biotechnol Bull (生物技术通报)*, 2015, 31: 71-77.
- [10] Peng GJ, Shi BY, Tian JS, et al. <sup>1</sup>H NMR based metabolomics study on the antidepressant effect of genipin in rat hippocampus [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 209-216.
- [11] Gao X, Liang M, Fang Y, et al. Deciphering the differential effective and toxic responses of Bupleuri Radix following the induction of chronic unpredictable mild stress and in healthy rats based on serum metabolic profiles [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 8: 995.
- [12] Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, et al. Human gut microbiota from autism spectrum disorder promote behavioral symptoms in mice [J]. *Cell*, 2019, 177: 1600-1618.
- [13] Hoyle L, Fernández-Real JM, Federici M, et al. Molecular phenomics and metagenomics of hepatic steatosis in non-diabetic obese women [J]. *Nat Med*, 2018, 24: 1070-1080.
- [14] Zhu SW, Gong WX, Chen CC, et al. The contribution of Radix Bupleuri-Radix Paeoniae Alba herb pair to Xiaoyaosan based on <sup>1</sup>H-NMR metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 720-728.
- [15] Chen DL, Yang X, Zheng CQ, et al. Extracts from *Hericium erinaceus* relieve inflammatory bowel disease by regulating immunity and gut microbiota [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 85838-85857.
- [16] Ogłodek EA, Just MJ, Szromek AR, et al. Melatonin and neurotrophins NT-3, BDNF, NGF in patients with varying levels of depression severity [J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 14: 721-731.
- [17] Abdallah IN, Ragab SH, Abd EBA, et al. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults [J]. *Arch Med Sci*, 2011, 3: 501-507.
- [18] Ran YL. Studies on Chemical Composition and Quality Control of Antidepressant Fractions from Xiaoyaosan (逍遥散抗抑郁有效部位化学成分及质量控制研究) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2012.
- [19] Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression [J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 67: 446-457.
- [20] Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis [J]. *Psychosom Med*, 2009, 71: 171-186.
- [21] Gao L, Li JQ, Zhou YZ, et al. The effects of baicalin on cortical pro-inflammatory cytokines and the intestinal microbiome in senescence accelerated mouse prone 8 [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2018, 9: 1714-1724.
- [22] Dziarski R, Park SY, Kashyap DR, et al. *Pglyrp*-regulated gut microflora *Prevotella falsenii*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides eggerthii* enhance and *Alistipes finegoldii* attenuates colitis in mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0146162.
- [23] Xu AQ, Li ZJ, Wang YL, et al. Progress in the researches on the gut-health-oriented functional foods [J]. *Food Mach (食品与机械)*, 2010, 26: 158-163.
- [24] Wang F, Jin Z, Shen K, et al. Butyrate pretreatment attenuates heart depression in a mice model of endotoxin-induced sepsis via anti-inflammation and anti-oxidation [J]. *Am J Emerg Med*,

- 2017, 35: 402-409.
- [25] Chen JZ, Vitetta L. Mitochondria could be a potential key mediator linking the intestinal microbiota to depression [J]. *J Cell Biochem*, 2019. DOI: 10.1002/jcb.29311
- [26] Thesing CS, Bot M, Milaneschi Y, et al. Omega-3 and omega-6 fatty acid levels in depressive and anxiety disorders [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, 87: 53-62.
- [27] Patra BN, Khandelwal SK, Chadda RK, et al. A controlled study of plasma fatty acids in Indian patients with depressive episode [J]. *Asian J Psychiatry*, 2018, 31: 152-156.
- [28] Zhang Z, Li H, Xu G, et al. Liver-targeted delivery of insulin-loaded nanoparticles *via* enterohepatic circulation of bile acids [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25: 1224-1233.
- [29] Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, et al. Functions and effects of creatine in the central nervous system [J]. *Brain Res Bull*, 2008, 76: 329-343.
- [30] Kious BM, Kondo DG, Renshaw PF. Creatine for the treatment of depression [J]. *Biomolecules*, 2019, 9: 406.
- [31] Lee HJ, Kim KW. Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61: 817-825.
- [32] Jeong JW, Cha HJ, Han MH, et al. Spermidine protects against oxidative stress in inflammation models using macrophages and zebrafish [J]. *Biomol Ther*, 2018, 26: 146-156.
- [33] Nahid A, Vahid G, Mehdi OM, et al. Taurine prevents mitochondrial membrane permeabilization and swelling upon interaction with manganese: implication in the treatment of cirrhosis-associated central nervous system complications [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2018, 32: e22216.
- [34] Yuan J, Yan CJ, Zhou Q, et al. Intervention of taurine on mice with depression model [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2019. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20190409.1356.022.html>.