

· 药理研究 ·

基于16s rDNA测序技术探讨加味孔圣枕中丹 对卒中后抑郁大鼠肠道菌群影响

欧春雪¹, 宋爱珍², 吴俏兰¹, 高祖¹, 高琳¹, 于华芸^{1,3}

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 山东协和学院, 山东 济南 250355;
3. 山东省中医经典名方协同创新中心, 山东 济南 250355)

摘要:目的 研究加味孔圣枕中丹对卒中后抑郁(post-stroke depression, PSD)大鼠肠道菌群的影响。方法 采用线栓法大脑中动脉闭塞结合孤养与慢性不可预知温和应激法制备PSD大鼠模型。造模成功的24只大鼠按随机数字表法分为模型组(model组)、加味孔圣枕中丹组(JWKSZZ组),另设空白组(control组),每组12只。JWKSZZ组给予11.34 g/kg中药水煎液灌胃,control组和model组给予等量0.9%氯化钠溶液灌胃,1次/d,干预4周。利用蔗糖偏好实验、强迫游泳实验进行行为学评价;HE染色观察海马CA1区神经元形态变化;16s rDNA扩增子测序技术进行肠道菌群检测。结果 与control组相比,model组大鼠体重显著下降,糖水偏好率降低明显,游泳不动时间显著延长($P<0.01$),大鼠海马CA1区神经元形态受损,放线菌门和变形菌门相对丰度升高,拟杆菌门和厚壁菌门相对丰度降低;与model组比较,JWKSZZ组能明显增加PSD大鼠体重,提高其糖水偏好率,缩短游泳不动时间($P<0.01$),改善海马CA1区锥体神经元形态,改变PSD大鼠肠道菌群组成结构,降低放线菌门和变形菌门相对丰度,升高拟杆菌门和厚壁菌门相对丰度,改变普雷沃菌科、普雷沃氏菌属、紫单胞菌科、颤螺旋菌属等群落相对丰度。结论 加味孔圣枕中丹改善PSD模型大鼠抑郁样行为可能与影响大鼠肠道微生物群落的结构和相对丰度,改善肠道微生物紊乱相关。

关键词:加味孔圣枕中丹;卒中后抑郁;肠道菌群;16s rDNA

中图分类号:R255.2;R277.7

文献标志码:A

DOI:10.13194/j.issn.1673-842X.2025.06.005

Effect of Jiawei Kongsheng Zhenzhong Pill (加味孔圣枕中丹) on Intestinal Flora in Rats with Post-Stroke Depression Based on 16s rDNA Technology

OU Chunxue¹, SONG Aizhen², WU Qiaolan¹, GAO Zu¹, GAO Lin¹, YU Huayun^{1,3}

基金项目:国家自然科学基金(81202641);山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MH345);山东中医药大学校级科学研究基金面上项目(KYZK2024M04)

作者简介:欧春雪(1998-),女,安徽蚌埠人,硕士在读,研究方向:方剂作用机制及药效物质基础研究。

通讯作者:于华芸(1977-),女,山东烟台人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:方剂作用机制及药效物质基础。

- [40] 中华中医药学会慢性心力衰竭中医诊疗指南项目组. 慢性心力衰竭中医诊疗指南(2022年)[J]. 中医杂志, 2023, 64(7): 743-756.
- [41] 王新婷, 贾美君, 刘永明. 太极拳对射血分数保留的心力衰竭患者临床疗效: 随机对照研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(8): 961-967.
- [42] 庞延, 林浩, 卢健棋, 等. 强心汤联合八段锦治疗老年慢性心力衰竭伴衰弱患者的临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(4): 104-109.
- [43] 薛亚楠, 曲怡, 王建波, 等. 补阳还五汤通过调控IL-6/STAT3信号通路减轻Ang II诱导的H9c2细胞损伤[J]. 科学技术与工程, 2023, 23(24): 10236-10244.
- [44] 高嵩松, 杜久钢, 刘媛媛, 等. 张艳教授对慢性心衰的中医认识与辨治[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(10): 77-78.
- [45] 迟楠, 张艳. 基于“心-脑-肾轴”理论的慢性心力衰竭防治[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 2953-2955.
- [46] 王琪格, 丁思元, 王群, 等. 从“血脉和利精神乃居”论治心脑血管疾病合并抑郁症[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(9): 109-111.
- [47] 胡佳骅, 张艳. 张艳“心-脑-肾”同调辨治慢性心力衰竭[J]. 实用中医内科杂志, 2016, 30(7): 1-2.
- [48] 莫飞智, 邓铁涛. 五脏神识系统的形成[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2010, 12(4): 545-549.
- [49] 王晔博, 李红奇, 胡雨桐, 等. 高玉瑛教授重视督脉学术思想的经验[J]. 天津中医药大学学报, 2018, 37(1): 6-9.
- [50] 唐三春, 张艳, 尹举, 等. 基于“心-脑-肾轴”理论治疗冠心病的临床体会[J]. 中医药临床杂志, 2022, 34(11): 2033-2037.
- [51] 程艳, 张苗苗, 国嵩, 等. “心与小肠相表里”理论的历史源流及发展脉络[J]. 中医杂志, 2023, 64(13): 1302-1307.
- [52] 于东林, 丁宝刚, 王斌胜, 等. 小肠“泌别清浊”文献源流探析[J]. 陕西中医药大学学报, 2018, 41(3): 13-15.
- [53] 王静, 朱海燕, 赵明镜, 等. 从“气、血、水”三因素探讨心衰合并利尿剂抵抗[J]. 湖北中医药大学学报, 2023, 25(1): 55-58.
- [54] IQBAL J, JAVAID M M. Diuretic resistance and its management[J]. Br J Hosp Med (Lond), 2014, 75(7): C103-C107.
- [55] NEUBERG G W, MILLER A B, O'CONNOR C M, et al. Diuretic resistance predicts mortality in patients with advanced heart failure[J]. Am Heart J, 2002, 144(1): 31-38.
- [56] 杨聪, 郑刚, 齐婧, 等. 中西医结合对慢性心力衰竭伴利尿剂抵抗疗效及客观指标影响的Meta分析[J]. 中国中医急症, 2021, 30(1): 27-31.
- [57] 宋欣瑜, 张治祥, 魏明明, 等. 中医治疗心力衰竭利尿剂抵抗的研究进展[J]. 中国中医急症, 2022, 31(5): 926-929.
- [58] 王艳霞, 张艳. 谈心力衰竭津液代谢障碍的中医思辨[J]. 湖北中医药大学学报, 2020, 22(1): 48-51.

(1.Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong, China;
2.Shandong Xiehe University, Jinan 250355, Shandong, China; 3.Shandong Co-Innovation
Center of Classic TCM Formula, Jinan 250355, Shandong, China)

Abstract: Objective To observe the possible mechanism of Jiawei Kongsheng Zhenzhong Pill (加味孔圣枕中丹) in the treatment of post-stroke depression (PSD) rats based on 16s rDNA technology. **Methods** Middle cerebral artery occlusion, and chronic unpredictable mild stress combined with isolated feeding were used to establish the PSD rat model. 24 successfully modeled rats were divided into the model group (model group) and the Jiawei Kongsheng Zhenzhong Pill group (JWKSZZ group) according to the random number table method. A blank group (control group) was also set up with 12 rats in each group. The JWKSZZ group was given tradition Chineses medicine decoction 11.34 g/kg by gavage, and the control group and model group were given the same amount of 0.9% sodium chloride solution, once a day for 4 weeks. Sucrose preference test and forced swim test were used to evaluate the depressive behaviors. The morphological changes of neurons in hippocampal CA1 were observe by HE staining. 16s rDNA sequencing technology for intestinal microbiota detection. **Results** Compared with the control group, the weight and sucrose preference rate of the model group decreased significantly, and the immobility time of forced swim was significantly longer ($P<0.01$), neuronal morphology in the CA1 areawas imparied, the relative abundance of *Actinomyces* and *Proteobacteria* was decreased, and the relative abundance of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* was increased. Compared with the model group, the JWKSZZ group could significantly increase the weight and sucrose preference rate of PSD rats, shorten the immobility time of FST ($P<0.01$), ameliorate hippocampal neuron damage, change the diversity and composition of intestinal flora in PSD rats, reduce the relative abundance of *Actinobacteria* and *Proteobacteria*, elevate the relative abundance of *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, and change the relative abundance of communities such as *Prevotellaceae*, *Prevotella*, *Porphyromonadaceae*, *Oscillibacte*. **Conclusion** Jiawei Kongsheng Zhenzhong Pill exerted anti-PSD effect may by affecting the structure and relative abundance of intestinal microbial communities and improving the disorder of intestinal microbial in rats.

Keywords: Jiawei Kongsheng Zhenzhong Pill (加味孔圣枕中丹); post-stroke depression; intestinal flora; 16s rDNA

卒中后抑郁(post-stroke depression, PSD)是脑卒中最常见的一种精神心理障碍并发症,发病率在11%~41%,其中在卒中后第1年患病率最高^[1-2],病死率约为单纯卒中患者的1.28~1.75倍^[3]。PSD不仅影响患者的身体健康,降低患者的生活质量,还带来极高的自杀率与自残率,给家庭及社会带来沉重负担与伤害。因此,深入探讨PSD相关发病机制,寻求潜在有效防治方法具有重要临床意义。肠道菌群是人体微生物的重要组成部分,可通过肠-脑轴影响中枢神经系统的功能^[4]。已有研究揭示肠道菌群失调与PSD的进展密切相关^[5],提示调节肠道菌群紊乱可能是PSD防治新策略。

加味孔圣枕中丹(JWKSZZ)是课题组前期以《备急千金要方》经典方剂孔圣枕中丹加味山茱萸、肉苁蓉、川芎、丹参化裁而来,具有补肾益髓、活血开窍之功效。课题组前期研究证明本方具有一定抗脑缺血损伤^[6]和抗PSD^[7]作用,但其对肠道菌群的影响尚不明确。本研究采用线栓法闭塞大脑中动脉(middle cerebral artery occlusion, MCAO)结合孤养加慢性不可预知温和应激法(chronic unpredictable mild stress, CUMS)制备PSD大鼠模型,利用16s rDNA扩增子测序技术观察JWKSZZ对PSD大鼠肠道菌群的影响,探讨其治疗PSD的可能作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠50只,6周龄,体质量(200±10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2016-0011。大鼠饲养于IVC独立送回风净化笼,恒温24℃,恒湿42%。实验

前适应性饲养1周,自由摄食、饮水。实验动物及操作均符合山东中医药大学医学实验动物中心伦理委员会原则,伦理批准号:SDUTCM20230828015。

1.2 药物

加味孔圣枕中丹药物组成:龟板、生龙骨各18g,丹参、山茱萸各15g,川芎、肉苁蓉各12g,石菖蒲、远志各9g,各药材饮片购自山东博康中药饮片有限公司。川芎、石菖蒲蒸馏提取挥发油6h,滤液及药渣暂存。龟板、龙骨打碎先煎30min后加入丹参、山茱萸、肉苁蓉、远志及川芎、石菖蒲药渣,煎煮30min,过滤。加入6倍蒸馏水再煎25min,过滤,合并滤液及挥发油,65℃水浴浓缩至1.134g/mL(生药浓度)。青霉素(山东鲁抗医药股份有限公司,批号:H37020079)。

1.3 主要试剂

QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit试剂盒(德国Qiagen,货号:51604);KAPA HiFi Hotstart ReadyMix PCR Kit试剂盒(德国KAPA Biosystems,货号:07958927001);AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒(美国Axygen Biosciences,货号:AP-GX-250)。

1.4 主要仪器

旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司);IVC独立送回风净化笼(山东新华医疗器械股份有限公司);大鼠强迫游泳筒(深圳瑞沃德生命科技有限公司);小动物麻醉机(深圳瑞沃德生命科技有限公司);紫外微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技);梯度PCR仪(美国赛默飞世尔科技);电泳仪(北京六一生物科技有限公司);凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 PSD模型建立

参照KUTS R等^[8]研究方法对38只大鼠行MCAO术制备局灶性缺血模型。术后腹腔注射青霉素20 000 U/d,共3 d。术后24 h参照文献方法进行改良神经功能评分(modified neuropathy symptom score, mNSS)^[9],评分为8~13分的MCAO大鼠于术后7 d(记为CUMS第0周, W0)采用孤养+CUMS法诱导建立PSD模型^[10]。刺激方法:禁食禁水20 h;禁水18 h;倾斜鼠笼(45°)17 h;持续照明36 h;湿笼21 h;4℃冰水游泳5 min;空间限制2 h;夹尾5 min;水平振荡5 min。每天交替采用2种刺激(长时和短时刺激各1种),持续2周。实验流程见图1。

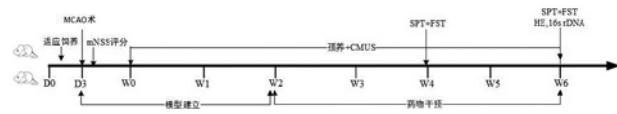


图1 实验流程

Fig. 1 Flowchart of the experiment

2.2 实验分组与给药

PSD造模成功24只,随机分为模型组(model组)、JWKSZZ组,另设空白组(control组),每组12只。按60 kg体质量成人临床等效剂量换算,分别予JWKSZZ水煎液11.34 g/kg体质量灌胃;control组和model组给予等容量0.9%氯化钠溶液灌胃,1次/d。体质量测定1次/周,调整给药剂量,持续给药干预4周;药物干预同时持续进行孤养和CUMS。

2.3 行为学指标

于CUMS 4周和6周时间点对各组大鼠进行蔗糖偏好实验和强迫游泳测试。

2.3.1 蔗糖偏好实验(sucrose preference test, SPT)

正式测试前,给予1%蔗糖水适应24 h。适应结束后,大鼠单笼饲养并禁水禁食12 h,分别给予提前称重的1瓶1%蔗糖水和1瓶纯净水,12 h后蔗糖水和纯净水互换位置。12 h后,收集剩余的蔗糖水和纯净水,称取质量,计算糖水偏好率=糖水摄入量/(糖水摄入量+纯净水摄入量)×100%。

2.3.2 强迫游泳测试(forced swimming test, FST)

将大鼠置于水深30 cm的圆柱形透明容器中,水温(20±2)℃,四周均无攀抓物,实验6 min,记录大鼠5 min累积不动时间(以仅有微小动作、保持头部浮在水面为不动标准)。

2.4 HE染色

于CUMS 6周时间点对大鼠断头取脑,4%多聚

甲醛固定24 h,脱水、浸蜡和包埋,石蜡切片机切成4 μm切片,进行HE染色封片,观察脑组织形态。

2.5 肠道内容物16s rDNA扩增子测序分析

末次给药后,control组、model组、JWKSZZ组随机挑选6只大鼠,禁食不禁水12 h。次日,异氟烷吸入麻醉剖取结肠末端内容物,无菌冻存管中-80℃冻存待测。

实验流程:(1)QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit试剂盒提取样本微生物总DNA;(2)Thermo Nano Drop 2000紫外微量分光光度计和1%琼脂糖凝胶电泳进行总DNA质检;(3)使用正向引物341F(5'-3': CCTACGGGGRSGCAGCAG)和反向引物806R(5'-3': GGACTACVV GGGTATCTAATC)扩增16s rDNA V3~V4区域;(4)KAPA HiFi Hotstart ReadyMix PCR kit试剂盒进行PCR扩增,反应条件为95℃预变性3 min,98℃变性20 s,58℃退火15 s,72℃延伸20 s,30个循环,72℃维持5 min;(5)PCR产物利用2%琼脂糖凝胶电泳检测,AxyPrep DNA凝胶提取试剂盒切胶回收纯化,进行文库制备与质检;(6)文库定量,Illumina Miseq平台PE250策略进行双末端测序;(7)生物信息学分析,使用Usearch(V7.0.1090)在0.97相似度下进行聚类、鉴定、嵌合体过滤,获得菌群可操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs);RDP方法进行OTUs物种分类和相对丰度分析;根据OTUs相对丰度进行Alpha、Beta多样性分析,物种差异和关联分析;R(V3.5.1)语言进行物种累积曲线、OTUs聚类和相对丰度构成可视化;LEfSe Tools进行物种差异分析。本研究测序由山东锐翌生物科技有限公司完成。

2.6 统计学分析

实验数据均采用Graphpad prism 8.0统计软件进行分析处理,计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠体质量及行为学指标比较

CUMS 4周和6周时间节点,与control组比较,model组大鼠体质量显著降低,糖水偏好率明显下降,游泳不动时间显著延长($P < 0.01$);与model组比较,JWKSZZ组大鼠体质量在CUMS 4周时间点变化不明显,差异无统计学意义,在CUMS 6周时间点显著增加($P < 0.01$),糖水偏好率在两个时间节点均有明显升高,游泳不动时间均有明显缩短($P < 0.01$)。见表1。

表1 各组大鼠体质量及行为学指标比较

Table 1 Comparison of body mass and behavioral parameters in each group of rats

($\bar{x} \pm s$)

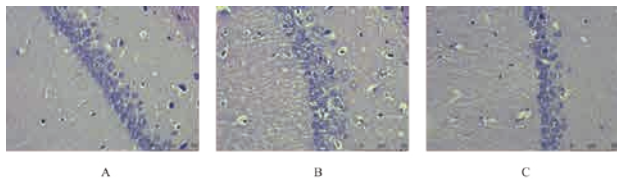
组别	n	剂量/ (g/kg)	体质量/g		糖水偏好率/%		游泳不动时间/s	
			4周	6周	4周	6周	4周	6周
control组	12	-	380.91 ± 32.42	417.67 ± 27.18	85.50 ± 3.34	87.67 ± 5.03	106.50 ± 13.26	98.00 ± 15.44
model组	12	-	275.25 ± 23.49 [#]	276.67 ± 22.97 [#]	61.00 ± 8.74 [#]	57.75 ± 11.72 [#]	139.83 ± 17.68 [#]	149.50 ± 20.66 [#]
JWKSZZ组	12	11.34	270.33 ± 19.25	328.75 ± 16.11 [▲]	70.17 ± 4.93 [▲]	82.75 ± 5.31 [▲]	121.67 ± 10.01 [▲]	126.92 ± 12.60 [▲]

注: #与control组比较, $P < 0.01$; ▲与model组比较, $P < 0.01$ 。

3.2 各组大鼠海马CA1区神经元形态变化比较

control组大鼠海马CA1区锥体神经元排列规则,较为紧密,胞核形态未见明显异常;model组大鼠海马神经元层次变少,排列稀疏且较为紊乱,细胞体

积较control组变大,胞核呈现染色质松散、固缩或核溶解消失等现象;JWKSZZ组海马锥体神经元损伤有一定改善,细胞形态及排列较模型组规则,胞核溶解现象好转。见图2。



注: A. control组; B. model组; C. JWKSZZ组。

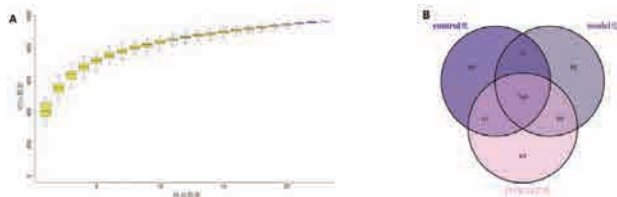
图2 各组大鼠海马CA1区神经元形态变化比较 (HE染色, ×400)

Fig. 2 Comparison of neuronal morphological changes in hippocampal CA1 area in each group of rats (HE, ×400)

3.3 16s rDNA扩增子测序分析

3.3.1 各组大鼠肠道菌群OTU比较

Specaccum物种累积曲线用于抽样量丰富性判断和物种丰富度估计。本研究物种累积曲线如图3A所示,随着样本数的增加,曲线逐渐平缓,样本中菌群种类和数量趋于平衡,表明实验样本量充足合理。以97%的一致性将序列进行OTU聚类,一个OTU代表一个物种,共获得938个OTUs。Venn图(图3B)显示control组有OTUs 692个, model组有760个, JWKSZZ组有745个。其中model组特有OTUs 88个, JWKSZZ组特有OTUs 69个。提示PSD造模后肠道细菌分类单元数目增加, JWKSZZ干预后肠道菌群单元数目有所减少, JWKSZZ可能减少了PSD发生、发展过程中某些有害菌群。



注: A. 物种累积曲线; B. OTU Venn图。

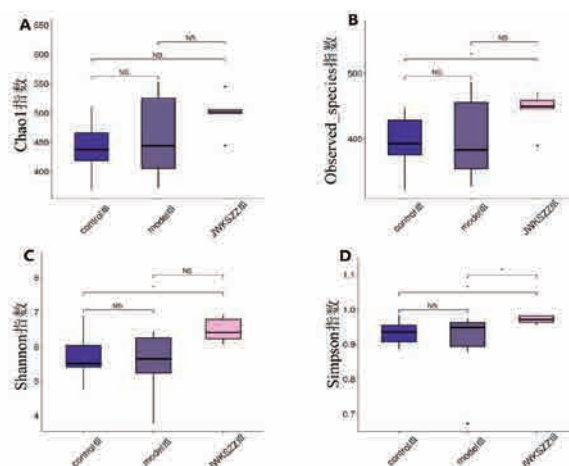
图3 各组大鼠肠道菌群OTU比较

Fig. 3 Comparison of OTU of intestinal flora in each group of rats

3.3.2 各组大鼠肠道菌群Alpha多样性指数比较

Alpha多样性分析中以Chao1和Observed_species指数反映菌群丰富度, Shannon和Simpson指数反映群落多样性。结果显示,与control组比较, model组大鼠肠道菌群的Chao1、Observed_species、Shannon、Simpson指数变化均无统计学意义;与model组比较, JWKSZZ组Simpson指数显著升高($P<0.05$)。表明

JWKSZZ对PSD大鼠肠道菌群多样性具有一定干预作用。见图4。



注: A. Chao1指数; B. Observed_species指数; C. Shannon指数; D. Simpson指数。* $P<0.05$ 。

图4 各组大鼠肠道菌群Alpha多样性指数比较

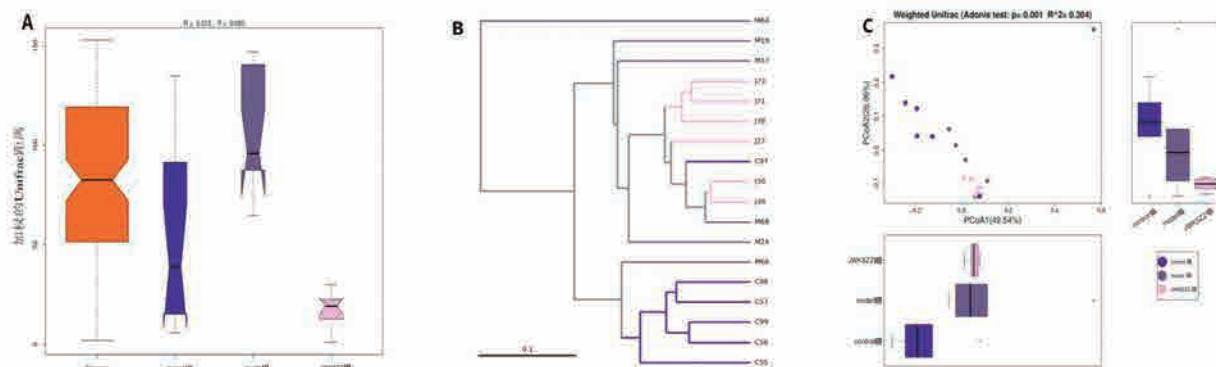
Fig. 4 Comparison of the Alpha diversity index of intestinal flora in each group of rats

3.3.3 各组大鼠肠道菌群Beta多样性指数比较

Beta多样性是衡量微生物群落物种组成差异程度的指标,用于评估不同群落之间的差异。对3组大鼠肠道菌群进行加权相似性(Anosim)分析、层级聚类分析、主坐标分析(PCoA)结合Adonis分析,见图5。Anosim分析(图5A)结果显示3组组间差异显著大于组内差异($P=0.003$),研究分组有意义。加权样本层级聚类分析(图5B)结果显示control组、JWKSZZ组聚为一类,部分model组样本与JWKSZZ组聚为一类,3组基本可分开归类。加权PCoA+Adonis分析(图5C)结果显示,3组大鼠菌群结构具有明显的聚类分离, control组与model组样本距离较远,分别处于不同区域; JWKSZZ组与model组虽存在部分重合交叉,但明显偏离model组(Adonis分析: $P=0.001$),提示PSD大鼠肠道菌群结构较control组有显著性变化, JWKSZZ可改变PSD大鼠肠道菌群的组成及结构变化。

3.3.4 各组大鼠肠道菌群物种组成比较

采用秩和检验对3组大鼠肠道菌群间明显差异物种进行显著性分析,获得23个差异物种。见表2。



注: A. 加权Anosim分析; B. 样本层级聚类分析; C. 加权PCoA+Adonis分析: PCoA1、PCoA2分别表示第一和第二主坐标,百分比则表示相应主坐标对样品差异的贡献率。

图5 各组大鼠肠道菌群Beta多样性指数比较

Fig. 5 Comparison of the Beta diversity index of intestinal flora in each group of rats

表2 所有水平差异显著物种列表
Table 2 List of species with significant differences in all levels

物种名称			P值	物种名称			P值
p_Actinobacteria	放线菌门		0.020	f_Porphyrimonadaceae	紫单胞菌科		0.020
p_Proteobacteria	变形菌门		0.008	f_Prevotellaceae	普雷沃菌科		0.022
c_Actinobacteria	放线菌纲		0.020	f_Streptococcaceae	链球菌科		0.035
c_Epsilonproteobacteria	ε-变形菌纲		0.003	g_Barnesiella	巴恩斯氏菌属		0.012
c_Erysipelotrichia	丹毒丝菌纲		0.028	g_Bilophila	嗜胆菌属		0.042
c_Negativicutes	阴性球菌纲		0.047	g_Clostridium IV	梭状芽胞杆菌属		0.008
o_Campylobacterales	弯曲菌目		0.003	g_Helicobacter	螺杆菌属		0.003
o_Erysipelotrichales	丹毒丝菌目		0.028	g_Lactococcus	乳球菌属		0.002
o_Rhodospirillales	红螺菌目		0.016	g_Oscillibacter	颤螺旋菌属		0.016
o_Selenomonadales	硒单胞菌目		0.047	g_Prevotella	普雷沃氏菌属		0.023
f_Erysipelotrichaceae	丹毒丝菌科		0.028	g_Salinococcus	盐水球菌属		0.035
f_Helicobacteraceae	螺杆菌科		0.003				

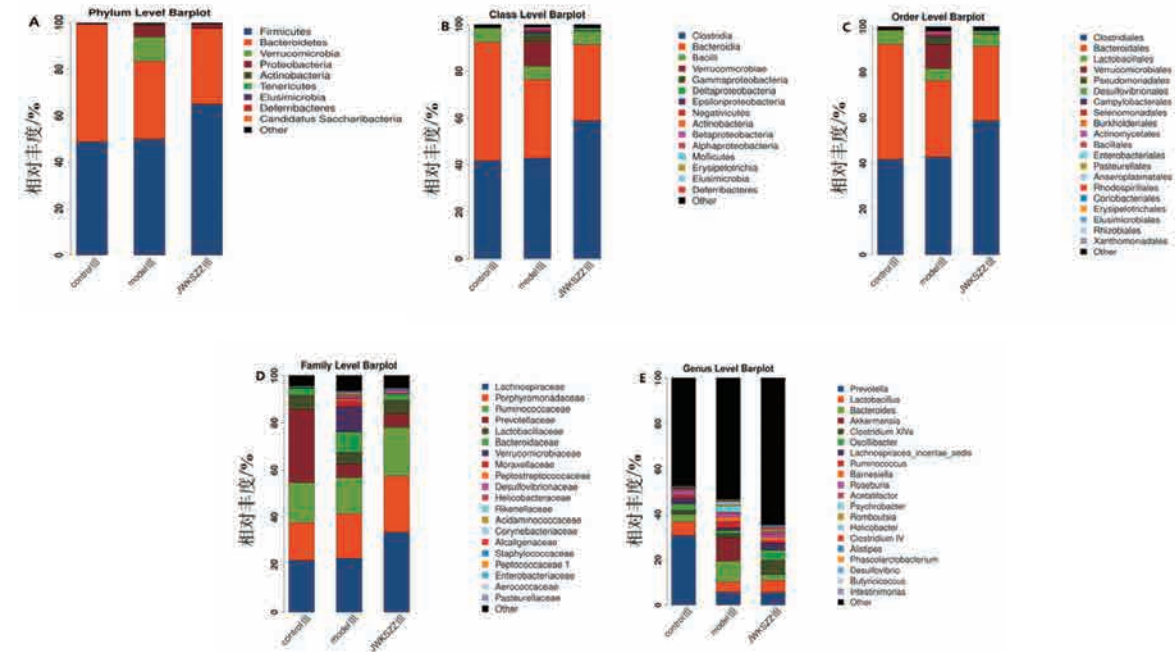
注: p. 门; c. 纲; o. 目; f. 科; g. 属。

(1) 门水平。control组、model组、JWKSZZ组大鼠肠道菌群均以厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)为主,其相对丰度总和占比分别为99.4%、83.5%和97.6%,而放线菌门和变形菌门相对丰度总和占比分别为0.34%、5.64%和1.86%。与control组比较,model组变形菌门、放线菌门等相对丰度升高,拟杆菌门、迷踪菌门等相对丰度降低;与model组比较,JWKSZZ组变形菌门、放线菌门相对丰度降低,厚壁菌门和拟杆菌门相对丰度上升。见图6A。(2) 纲水平。与control组比较,model组放线菌纲、ε-变形菌纲、丹毒丝菌纲等相对丰度升高;与model组比较,JWKSZZ组放线菌纲、ε-变形菌纲等相对丰度降低。见图6B。(3) 目水平。与control组比较,model组弯曲菌目、丹毒丝菌目、红螺菌目等相对丰度升高;与model组比较,JWKSZZ组弯曲菌目、丹毒丝菌目、红螺菌目等相对丰度降低。见图6C。(4) 科水平。与control组比较,model组螺杆菌科等相对丰度升高,普雷沃菌科、理研菌科

(*Rikenellaceae*)等相对丰度降低。与model组比较,JWKSZZ组螺杆菌科等相对丰度降低,紫单胞菌科、理研菌科等相对丰度升高。见图6D。(5) 属水平。与control组比较,model组*Barnesiella*、螺杆菌属等菌群相对丰度升高,颤螺旋菌属、普雷沃氏菌属等相对丰度降低。与model组比较,JWKSZZ组螺杆菌属等菌群相对丰度降低,*Clostridium IV*、颤螺旋菌属等菌群相对丰度升高。见图6E。

3.3.5 各组大鼠肠道菌群LEfSe差异比较

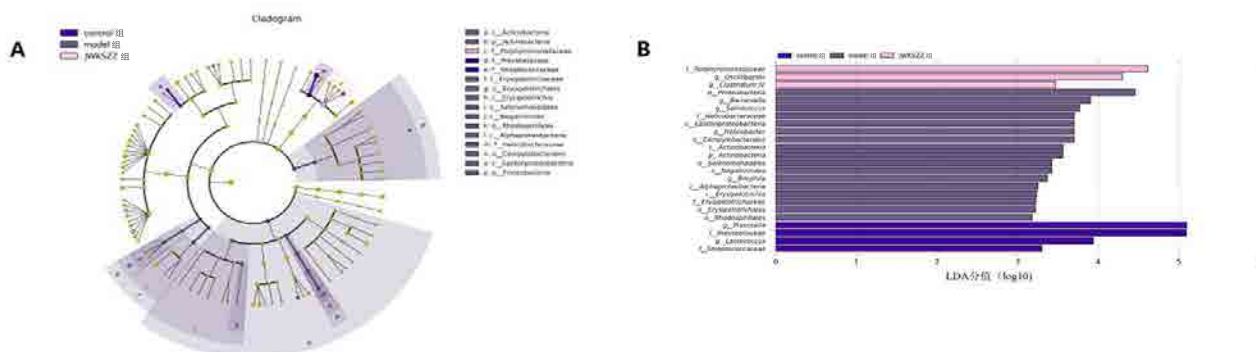
采用LEfSe的线性判别分析(LDA)比较3组大鼠从门到属的肠道菌群谱,确定差异丰富的群落或物种(LDA评分阈值>2.0),结果见图7。链球菌科、乳球菌属、普雷沃菌科、普雷沃氏菌属、颤螺旋菌属为control组中具有重要作用的微生物群。model组具有重要作用特征性微生物群,门水平上为放线菌门、变形菌门,纲水平为放线菌纲、α-变形菌纲、ε-变形菌纲、丹毒丝菌纲、*Negativicutes*纲,目水平为红螺菌目、弯曲菌目、丹毒丝菌目、硒单胞菌目,科水平



注: A. 门水平; B. 纲水平; C. 目水平; D. 科水平; E. 属水平。

图6 各组大鼠肠道菌群物种组成相对丰度比较

Fig. 6 Comparison of relative abundance of species composition of intestinal flora in each group of rats



注: A.LEfSe 分析聚类树; B.LEfSe 分析 LDA 值分布柱状图。不同颜色表示不同分组,不同颜色节点表示在该颜色所代表的分组中起到重要作用的微生物群。黄色节点表示的是无重要作用的微生物类群。

图7 各组大鼠肠道菌群LEfSe差异比较

Fig. 7 Comparison of LEfSe differences of intestinal flora in each group of rats

为螺杆菌科、丹毒丝菌科,属水平上为螺杆菌属、嗜胆菌属、盐水球菌属、*Barnesiella* 属。涉及2门、5纲、4目、2科、3属。JWKSZZ组具有重要作用的微生物群为紫单胞菌科、颤螺旋菌属、梭状芽胞杆菌属。

4 讨论

PSD属于中医学郁证之“因病致郁”范畴,病位在脑、肾,多为本虚标实证。其常见病机为肾精亏虚、瘀血阻滞,治宜益肾填精、活血通络。PSD与脑卒中的预后密切相关,其早期识别和及时预防治疗具有重要意义^[11]。近年有学者提出“肾精”与肠道菌群存在内在联系,认为二者在人体生长壮老已的过程中所展现的基本生命规律相似,可影响骨骼健康,调控介导神经系统发育等^[12]。肠道菌群与肾精的相关性,为补肾方剂防治脑病提供了新思路。目前PSD的临床药物治疗仍以抗抑郁药为主,如5-羟色胺(5-HT)再摄取抑制剂、单氨氧化酶抑制剂等,但存在致失眠、性欲减退,甚至认知障碍及肝毒性等不良反^[13]。中药及复方具有多成分、多效应、多靶点、不良反应小等特点,在改善抑郁症状的同时,还可促进神经功能康复等,在临床上取得较好的疗效,受到广泛关注^[14]。

JWKSZZ方中龟板、山茱萸、肉苁蓉填精益髓、温助肾阳,川芎、丹参活血祛瘀,石菖蒲开窍醒神,远志、龙骨安神定志。诸药相合补肾活血、开窍宁神,尤适用于肾虚瘀阻型PSD的防治。前期实验研究显示本方可显著改善PSD模型大鼠抑郁样行为^[7],现代药理学研究亦证实方中石菖蒲、远志等中药有确切抗抑郁作用^[15-17]。海马与学习记忆、情绪调节等功能有关,PSD发病与其结构及功能改变密切相关^[18],研究发现本方可增加PSD模型大鼠体质量,恢复大鼠对糖水的消耗,缩短其游泳不动时间,缓解模型大鼠卒中后抑郁症状,并对其海马神经元损伤有一定改善作用,提示JWKSZZ临床防治PSD的应用前景,但作用机制有待进一步研究。本研究应用16s rDNA扩增子测序技术进一步观察JWKSZZ对缺血性PSD大鼠肠道菌群的影响。

厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门是肠道菌群的主要组成部分。本研究发现PSD大鼠表现出较为显著的肠道微生物群落紊乱,肠道拟杆菌门、厚壁菌门相对丰度降低,放线菌门、变形菌门相对丰度升高,与刘兰香等^[19]研究结果相符。而JWKSZZ

对上述菌群相对丰度具有一定调节作用,其可升高拟杆菌门和厚壁菌门相对丰度,降低放线菌门和变形菌门相对丰度,一定程度改善肠道菌群紊乱。链球菌科、乳球菌属、普雷沃菌科、普雷沃氏菌属和颤螺旋菌属是control组大鼠肠道中具有重要作用的菌群。普雷沃菌科、普雷沃菌属是拟杆菌门成员,链球菌科、乳球菌属、颤螺旋菌属为厚壁菌门主要成员。研究发现普雷沃菌等拟杆菌可发酵膳食纤维产生乙酸、丙酸、丁酸、醋酸等短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA), SCFAs可调节体内5-HT水平,其变化与年轻人的抑郁症相关^[20],已证实SCFAs可通过调节神经发生促进脑缺血后神经功能恢复^[21],补充SCFAs可改善难治性抑郁模型大鼠的抑郁样行为^[22],且低剂量的丙酸盐可改善海马中神经递质的代谢紊乱,从而发挥抗抑郁作用^[23]。单胺类神经递质的耗尽被认为是抑郁症发病的重要诱因,目前临床多数抗抑郁药是通过抑制相关受体或酶,增加突触间隙中神经递质水平,研究证实厚壁菌门的链球菌科、乳球菌属可促进5-HT、多巴胺等单胺类神经递质产生^[24]。提示生理状态下肠道菌群可通过产生一系列神经递质、神经活性化合物或代谢物对中枢神经系统产生良性调节作用。

PSD大鼠与control组大鼠肠道菌群Beta多样性分析存在显著差异,提示模型大鼠肠道菌群结构发生明显改变,其中SCFAs生产者,如拟杆菌门、普雷沃菌科、普雷沃菌属等相对丰度显著下降,而抑郁症相关菌群放线菌门、变形菌门等的结构和相对丰度发生显著变化,与LING Y等^[25]对脑卒中后共患认知障碍与抑郁症患者肠道菌群影响研究结果相似,SCFAs产生菌相对丰度降低,而包括γ-变形菌纲在内的变形菌门相对丰度增加。越来越多的证据表明,炎症反应参与了抑郁症的发病,其可通过影响单胺类神经递质的分泌、合成等促进神经胶质细胞活化,从而引发抑郁症^[26-27]。有研究发现PSD模型大鼠肠道主要差异物种螺杆菌,会诱导体液和细胞免疫反应,与中枢神经系统成分发生交叉反应,导致神经组织损伤^[28],而嗜胆菌也证实慢性炎症疾病中发挥一定作用。以上提示脑缺血、应激刺激后大鼠的肠道菌群发生了显著性变化,表现为产SCFAs菌相对丰度减少,部分条件致病菌相对丰度增加,从而通过代谢途径、单胺类神经递质途径以及免疫等途径

参与脑缺血损伤以及抑郁症发生发展。

JWKSZZ组大鼠与PSD大鼠肠道菌群Simpson指数、Beta多样性分析存在显著差异,提示JWKSZZ可一定程度干预PSD大鼠肠道菌群物种多样性,调整菌群的组成及结构变化,降低变形菌门、放线菌门、放线菌纲、弯曲菌目、螺杆菌科、螺杆菌属等相对丰度,升高紫单胞菌科、理研菌科、颤螺旋菌属等相对丰度。JWKSZZ组的特征菌群紫单胞菌科和理研菌科为拟杆菌门成员,其相对丰度升高与老年人的内脏脂肪组织减少及更健康的代谢特征相关^[29];理研菌科与炎症细胞因子呈负相关,磷脂酰胆碱可通过增加理研菌科、毛螺菌科的相对丰度重塑LPS小鼠的肠道微生物组结构,改善大脑炎症反应和认知障碍^[30];帕金森病模型小鼠5-HT和多巴胺代谢途径紊乱与理研菌科相对丰度降低相关^[31]。表明JWKSZZ可能通过降低机会致病菌相对丰度、增加有益菌的相对丰度、改善炎症反应、影响单胺类神经递质途径等发挥一定抗缺血损伤和改善抑郁症状作用。

5 结论

综上所述,脑缺血叠加慢性不可预知性刺激可导致大鼠出现抑郁行为,伴随海马神经元损伤、肠道菌群紊乱,JWKSZZ可改善脑组织损伤,调节PSD大鼠肠道菌群的结构和相对丰度,促进肠道微生态重建,这可能是其发挥抗抑郁作用的重要生物学基础。后续将进一步结合代谢组学技术深入研究JWKSZZ调节肠道菌群治疗PSD的作用机制。◆

参考文献

- [1] GUO J L, WANG J J, SUN W, et al. The advances of post-stroke depression: 2021 update [J]. Journal of Neurology, 2022, 269 (3): 1236-1249.
- [2] LAN Y, PAN C S, QIU X L, et al. Nomogram for persistent post-stroke depression and decision curve analysis [J]. Clin Interv Aging, 2022, 17: 393-403.
- [3] BARTOLI F, DI BRITA C, CROCAMO C, et al. Early post-stroke depression and mortality: meta-analysis and meta-regression [J]. Frontiers in Psychiatry, 2018, 9: 530.
- [4] LIU L S, HUH J R, SHAH K. Microbiota and the gut-brain-axis: implications for new therapeutic design in the CNS [J]. eBioMedicine, 2022, 77: 103908.
- [5] JIANG W X, GONG L, LIU F, et al. Alteration of gut microbiome and correlated lipid metabolism in post-stroke depression [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 663967.
- [6] 武冰, 吴智春, 季旭明, 等. 加味孔圣枕中丹对局灶性脑缺血模型大鼠神经细胞凋亡的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35 (22): 6325-6327.
- [7] 宋爱珍. 加味孔圣枕中丹调控Netrin-1/DCC信号通路介导突触重塑干预PSD的作用及机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2022.
- [8] KUTS R, MELAMED I, SHIYNTUM H N, et al. A middle cerebral artery occlusion technique for inducing post-stroke depression in rats [J]. Journal of Visualized Experiments, 2019, 147: 121.
- [9] ZHANG Y, YIN Y L, JIN Z Y, et al. Electroacupuncture activates neuroplasticity in the motor cortex and corticospinal tract via the mTOR pathway in a rat P-MCAO Model [J]. BioMed Research International, 2022, 2022: 1-14.
- [10] TAO X, YANG W L, ZHU S Z, et al. Models of poststroke depression and assessments of core depressive symptoms in rodents: How to choose? [J]. Experimental Neurology, 2019, 322: 113060.
- [11] 宋景贵, 王长虹, 吕路线, 等. 脑卒中后抑郁临床诊疗指南 [J]. 临床心身疾病杂志, 2020, 26 (3): 199-204.
- [12] 丰雪, 耿少辉, 刘豫蒙, 等. 论肠道菌群与中医肾精的相关性 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36 (2): 780-783.
- [13] 王先萍, 刘丽容, 罗琪丰, 等. 临床常用抗抑郁药物不良反应研究进展 [J]. 台州学院学报, 2022, 44 (6): 71-77.
- [14] 杨宝秀, 陈少玫. 卒中后抑郁的中医药研究进展 [J]. 中医临床研究, 2021, 13 (12): 34-37.
- [15] 石坚宏, 姬丽婷, 骆启哈, 等. 石菖蒲化学成分、药理作用及质量标志物预测分析研究进展 [J]. 中成药, 2021, 43 (5): 1286-1290.
- [16] 姚学敏, 周晓洁, 周妍妍, 等. 远志化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2022, 50 (2): 103-107.
- [17] 李佳欣, 陈思琦, 葛鹏玲. 山茱萸药理学研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24 (4): 63-66.
- [18] 闫桂柳, 郭旺, 杨雪萍, 等. 脑卒中后抑郁大鼠海马星形胶质细胞脑源性神经营养因子及其受体的表达变化 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2023, 25 (4): 425-428.
- [19] 刘兰香, 王海洋, 谢鹏. 肠道微生物紊乱诱导抑郁的肠-脑分子机制研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46 (9): 1003-1007.
- [20] MÜLLER B, RASMUSSEN A J, JUST D, et al. Fecal short-chain fatty acid ratios as related to gastrointestinal and depressive symptoms in young adults [J]. Psychosomatic Medicine, 2021, 83 (7): 693-699.
- [21] 程希. 高膳食纤维饮食对小胶质细胞的调节作用影响脑缺血后神经再生机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.
- [22] PALEPU M S K, GAJULA S N R, MALLESHWARI K, et al. SCFAs supplementation rescues anxiety- and depression-like phenotypes generated by fecal engraftment of treatment-resistant depression rats [J]. ACS Chemical Neuroscience, 2024, 15 (5): 1010-1025.
- [23] HAO C Y, GAO Z F, LIU X J, et al. Intravenous administration of sodium propionate induces antidepressant or prodepressant effect in a dose dependent manner [J]. Scientific Reports, 2020, 10: 19917.
- [24] KIM N, YUN M S, OH Y J, et al. Mind-altering with the gut: modulation of the gut-brain axis with probiotics [J]. Journal of Microbiology, 2018, 56 (3): 172-182.
- [25] LING Y, GU Q L, ZHANG J M, et al. Structural change of gut microbiota in patients with post-stroke comorbid cognitive impairment and depression and its correlation with clinical features [J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2020, 77 (4): 1595-1608.
- [26] FRANK D, GRUENBAUM B F, ZLOTNIK A, et al. Pathophysiology and current drug treatments for post-stroke depression: a review [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23 (23): 15114.
- [27] ZHAN Q Y, KONG F Y. Mechanisms associated with post-stroke depression and pharmacologic therapy [J]. Frontiers in Neurology, 2023, 14: 1274709.
- [28] DERETZI G, KOUNTOURAS J, POLYZOS S A, et al. Gastrointestinal immune system and brain dialogue implicated in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases [J]. Curr Mol Med, 2011, 11 (8): 696-707.
- [29] TAVELLA T, RAMPPELLI S, GUIDARELLI G, et al. Elevated gut microbiome abundance of Christensenellaceae, Porphyromonadaceae and Rikenellaceae is associated with reduced visceral adipose tissue and healthier metabolic profile in Italian elderly [J]. Gut Microbes, 2021, 13 (1): 1-19.
- [30] TAN W, ZHANG Q J, DONG Z J, et al. Phosphatidylcholine ameliorates LPS-induced systemic inflammation and cognitive impairments via mediating the gut-brain axis balance [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68 (50): 14884-14895.
- [31] ZHU Y H, HUAN F, WANG J F, et al. 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine induced Parkinson's disease in mouse: potential association between neurotransmitter disturbance and gut microbiota dysbiosis [J]. ACS Chemical Neuroscience, 2020, 11 (20): 3366-3376.