

基于肠道菌群和非靶向代谢组学探讨短双歧杆菌组合改善慢性不可预知温和应激抑郁大鼠的作用机制

董若彤, 蔡静怡, 杨婷婷, 朱斯斯, 曹国胜, 艾中柱*

湖北中医药大学 药学院, 湖北 武汉 430065

摘要: 目的 联合16S rDNA技术和代谢组学技术评价短双歧杆菌组合(BBC)抗抑郁的活性及作用机制。方法 选取36只大鼠随机分为4组: 对照组、模型组、BBC(短双歧杆菌BBR60:两歧双歧杆菌BBi32:长双歧杆菌BL21:嗜热链球菌ST36=1:1:1:1, 1.5×10^9 CFU·d⁻¹)组和氟哌噻吨美利曲辛片(阳性药, 1.0 mg·kg⁻¹)组, 除对照组外建立慢性不可预知温和应激(CUMS)抑郁大鼠模型, 模型成功后ig给药4周, 进行糖水偏好实验、强迫游泳实验和旷场实验评价大鼠抑郁行为, 酶联免疫吸附(ELISA)法测定血清5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)和去甲肾上腺素(NE)的水平, 苏木素-伊红(HE)染色观察海马CA1和CA3区的神经元细胞数目和形态变化; 应用16S rDNA扩增子测序和非靶向代谢组学技术探讨BBC对抑郁大鼠肠道菌群及代谢产物的调控作用, 结合Spearman系数法构建差异菌群、代谢产物的关联性。结果 与模型组比较, BBC可有效改善大鼠抑郁样行为($P<0.05, 0.01$), 提高血清中5-HT、DA和NE的水平, 增加神经元细胞数目; 有效改善抑郁大鼠的菌群失调, 尤其对Bacilli纲、Lactobacillales目、Lactobacillaceae科和Lactobacillus属等菌群有回调作用($P<0.05, 0.01$); 采用粪便代谢组学鉴定出与抗抑郁作用有关的主要生物标志物为1-羟-2-萘甲酸、甘草黄酮A、N-乙酰组胺等, 采用血清代谢组学鉴定出与抗抑郁有关的主要生物标志物为二十二碳五烯酸、顺式-11-二十碳烯酸、3'-O-甲基巴塔氨酸III等; 同时发现Lactobacillus和clostridia_UCG-014与差异代谢物存在显著关联; 主要富集的通路是不饱和脂肪酸的生物合成、色氨酸代谢、丁酸代谢和烟酸和烟酰胺代谢等代谢途径。结论 BBC可通过干预相关肠道菌群和调节相关通路缓解慢性压力导致的抑郁相关症状。

关键词: 短双歧杆菌组合; 抑郁症; 慢性不可预知温和应激; 肠道菌群; 非靶向代谢组学; 色氨酸代谢; 丁酸代谢

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)12-2757-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.12.006

Mechanistic of combination of *Bifidobacterium brevis* in improvement of chronic unpredictable mild stress-induced depression in rats based on gut microbiota and non-targeted metabolomics

DONG Ruotong, CAI Jingyi, YANG Tingting, ZHU Sisi, CAO Guosheng, AI Zhongzhu

School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

Abstract: **Objective** This study aimed to investigate the antidepressant mechanisms of combination of *Bifidobacterium brevis*, based on 16S rDNA technology and metabolomics technology. **Methods** Select 36 rats at random and divide them into four groups: control group, model group, BBC group (*Bifidobacterium bifidum* BBR60: *Bifidobacterium bifidum* BBi32: *Lactobacillus reuteri* BL21: *Streptococcus thermophilus* ST36 = 1:1:1:1, 1.5×10^9 CFU·d⁻¹) and Fluoxetine and Mirtazapine Tablets (positive drug, 1.0 mg·kg⁻¹), except the control group, to establish a CUMS depression rat model with chronic unpredictable mild stress. After the model was successfully established, the rats were ig administered BBC or Fluoxetine and Mirtazapine Tablets for four weeks. The rat depressive behaviors were evaluated by the sucrose preference test, forced swimming test, and open field test, and the levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT), dopamine (DA), and norepinephrine (NE) in the serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The number and morphological changes of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions were

收稿日期: 2024-07-09

基金项目: 2022年湖北省自然科学基金面上类项目(2022CFB849); 2022年湖北省教育厅科学研究项目(Q20222014)

第一作者: 董若彤, 女, 硕士研究生, 从事抑郁症的发病机制及药物干预作用研究。E-mail: 18727661994@163.com

*通信作者: 艾中柱, 男, 讲师, 博士, 从事抑郁症的发病机制及药物干预作用研究。E-mail: zeroai2009@126.com

observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The effects of BBC on the gut microbiota and metabolites of depressed rats were explored by 16S rDNA amplicon sequencing and non-targeted metabolomics, and the correlation between differential gut microbiota and metabolites was established by Spearman's coefficient. **Results** Compared with the model group, BBC effectively ameliorated depressive-like behaviors ($P < 0.05$ and 0.01), enhanced the levels of 5-HT and DA in the serum and increased the number of neurons in rats. It also restored gut microbiota dysbiosis, particularly by modulating taxa such as Bacilli class, Lactobacillales order, Lactobacillaceae family, and *Lactobacillus* genus ($P < 0.05$, 0.01). The key biomarkers associated with the antidepressant effect identified through fecal metabolomics included 1-hydroxy-2-naphthoic acid, glycyrrhizin A, and *N*-acetylhistamine, while serum metabolomics revealed key biomarkers such as docosapentaenoic acid, cis-11-eicosenoic acid, and 3'-*O*-methylbatanin III. Significant associations were found between *Lactobacillus* and Clostridia_UCG-014 and differential metabolites. The enriched pathways included unsaturated fatty acid biosynthesis, tryptophan metabolism, butanoate metabolism, and nicotinate and nicotinamide metabolism, among others. **Conclusion** BBC alleviates depression-related symptoms induced by chronic stress by modulating gut microbiota and regulating associated metabolic pathways.

Key words: combination of *Bifidobacterium brevis*; depression; chronic unpredictable mild stress; gut microbiota; non-targeted metabolomics; tryptophan metabolism; butyric acid metabolism

抑郁症是世界上最普遍的精神疾病之一, 伴随情绪低落、自卑、睡眠障碍、注意力不集中、缺乏兴趣的病理特征, 全球发病率约5%^[1]。世界卫生组织将重度抑郁症列为全球疾病负担的第3大原因, 并预测到2030年将位居第1位^[2-3]。研究表明, 抑郁症呈现显著的年轻化趋势^[4]。临床常见治疗抗抑郁药物副作用大、患者依从性差^[5]。因此, 亟待寻找新的治疗抑郁症的方法。

肠道微生物群在肠道和大脑之间的双向交流中发挥着至关重要的作用, 与精神疾病的发展关系密切^[6]。通过前期收集大学生抑郁症临床粪便样本, 开展肠道菌群测序研究, 发现在抑郁患者和正常人中, 双歧杆菌属和链球菌属为差异菌群^[7-8]。另外, 动物研究发现短双歧杆菌、长双歧杆菌和两歧双歧杆菌通过调节肠道菌群、降低炎症反应和提高体内单胺类神经递质水平来改善抑郁, 嗜热链球菌已被证实可逆转压力导致的肠道微生物群改变, 减轻抑郁样行为^[9-12]。临床证据表明补充短双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌和嗜热链球菌有助于改善患者抑郁症状^[13-14]。但是目前关于这4种菌如何作用于抑郁患者的机制不清楚。根据相关研究结果结合预试验, 本研究从肠道菌群的角度, 结合非靶向代谢组学探讨短双歧杆菌组合(短双歧杆菌 BBr60: 两歧双歧杆菌 BBi32: 长双歧杆菌 BL21: 嗜热链球菌 ST36=1: 1: 1: 1, combination of *Bifidobacterium brevis*, BBC)^[15]对慢性不可预知温和应激(CUMS)诱导抑郁症大鼠抗抑郁的药效作用机制, 为该制剂的临床开发使用提供理论参考。

1 材料

1.1 动物

SPF级 Sprague-Dawley 雄性6~8周大鼠36只, 体质量(200 ± 20)g, 由三峡大学动物实验中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK(鄂)2022-0012, 动物质量合格证号 42010200009753, 购买后饲养于湖北中医药大学 SPF 级实验动物中心, 期间自由摄食、饮水。所有实验动物适应性饲养7 d后进行实验。动物实验设计方案得到湖北中医药大学动物实验伦理委员会批准(HBUCMS-202331435)

1.2 益生菌来源

短双歧杆菌 BBr60 (*Bifidobacterium brevis*, BBr60)、两歧双歧杆菌 BBi32 (*Bifidobacterium bifidum*, BBi32)、长双歧杆菌 BL21 (*Bifidobacterium longum*, BL21)、嗜热链球菌 ST36 (*Streptococcus thermophilus*, ST36), 均购于微康益生菌(苏州)股份有限公司。

1.3 药物和主要试剂

氟哌噻吨美利曲辛片(FTM, 批号230605)购于海思科制药(眉山)有限公司; 蔗糖购于武汉黑糖源商贸有限公司; 大鼠5-羟色胺(5-HT)酶联免疫吸附测定试剂盒(货号E-EL-0033)、大鼠多巴胺(DA)酶联免疫吸附测定试剂盒(货号E-EL-0046)、大鼠去甲肾上腺素(NE)酶联免疫吸附测定试剂盒(货号E-EL-0047), 均购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; 苏木精-伊红(HE)染色液套装(批号1950156)购于武汉皮诺飞生物科技有限公司; 无水乙醇(批号20240419)、中性树胶(批号10004160)均购于国药集团化学试剂有限公司; DNeasy PowerSoil Kit(50)(批号175039737)购于德国 QIAGEN 公司;

VAHTS HiFi Universal Amplification Mix (批号 7E712F3) 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 蛋白酶K溶液(批号 23011844) 购于北京兰杰柯科技有限公司。

1.4 主要仪器

旷场实验装置(定制, 长 45 cm、宽 35 cm、高 50 cm), 大鼠强迫游泳实验测试桶(定制, 直径 20 cm、高 45 cm); Tecan Spark10M 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); JT-12S 脱水机、JB-L5 包埋机(武汉俊杰电子有限公司); RM2016 病理切片机(LEICA 公司); Panoramic SCAN II 扫描仪(济南丹吉尔电子有限公司); IA2002 电子天平(上海沪析实业有限公司); IMS-30 全自动雪花制冰机(常熟市学科电器有限公司); DYY-6C 电泳仪(北京六一公司); TissueLyser 多样品组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司); Tanon-1600 紫外拍胶仪(上海天能公司); Nanodrop ONE (Thermo scientific 公司); Vanquish 超高效液相色谱仪、Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱、Heraeus Fresco17 离心机(Thermo Fisher Scientific 公司); BSA124S-CW 天平(Sartorius 公司); PS-60AL 超声仪(深圳市雷德邦电子有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

所有大鼠适应性喂养1周, 将大鼠随机分为对照组($n=9$)和造模组($n=27$)。造模组大鼠参照文献报道^[16-17]的方法加以改进, 采用CUMS应激结合孤养进行造模。大鼠每天接受不同的应激刺激, 包括: 禁食 24 h、禁水 24 h、鼠笼倾斜 45° 24 h、潮湿垫料 24 h、接触异物 24 h、夹尾 3 min、水平震荡 10 min、冰水游泳 10 min、昼夜颠倒、禁食禁水 24 h。每天随机选择1种应激刺激, 且相邻2 d的刺激方式不相同。连续刺激 28 d 后, 将造模大鼠依据行为学测试的结果和体质量随机分为模型组($n=9$)、BBC (1.5×10^9 CFU·d⁻¹^[13-14], $n=9$) 组和 FMT ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 阳性药, $n=9$) 组, 对照组和模型组给予等量的纯水, 每天 ig 给药 1 次, 连续给药 28 d。将4种益生菌等比例溶于纯水中制成菌悬液即得到 BBC, 现配现用。药物干预期间, 各组 CUMS 抑郁大鼠继续给予应激刺激。实验期间, 每周记录1次大鼠体质量。

2.2 行为学测试

2.2.1 糖水偏好实验 参照文献报道^[18]的方法加以改进, 正式实验前, 训练大鼠进行糖水适应, 第1

天放置2瓶1%的蔗糖水, 第2天放置1瓶1%的蔗糖水, 用1瓶纯净水代替其中1瓶蔗糖水, 2瓶位置随机, 期间大鼠自由饮用。再禁食禁水 12 h, 所有大鼠给予随机放置的1瓶纯水和1瓶1%蔗糖溶液进行糖水消耗实验, 实验前对蔗糖水和纯水进行称质量, 1.5 h 后交换水瓶的位置, 3 h 后称量蔗糖水和纯水的质量, 根据2次称量的质量差计算糖水偏好率。

糖水偏好率 = 蔗糖水消耗量 / (蔗糖水消耗量 + 纯水消耗量)

2.2.2 强迫游泳实验 参照文献报道^[19]的方法加以改进, 实验时将游泳水箱内的水温调节至室温 (24 ± 2) °C, 然后把大鼠放入游泳水箱中, 游泳时长为 6 min, 其中前 2 min 适应, 记录后 4 min 大鼠的不动时间。记录不动时间标准如下: ①停止挣扎; ②直立漂浮在水面上; ③四肢偶尔活动以使其头部浮在水面之上。

2.2.3 旷场实验 参照文献报道^[19]的方法加以改进, 保持室内安静, 将各组大鼠轻轻放入旷场实验箱正中央, 通过顶部的摄像头记录 5 min 内的行动轨迹, 2 min 为适应期, 取后 3 min 的结果, 记录大鼠总运动距离和平均运动速度。每测完1只大鼠后, 用 75% 乙醇喷洒箱底, 避免气味干扰下一只大鼠结果。采用动物行为学分析软件 Tracker 6.1.2 (<https://tracker.physlets.org/>) 对实验结果进行分析。

2.3 样本收集与制备

各组大鼠粪便样本在末次给药 24 h 内被收集, 保存于 -80 °C 冰箱, 用于肠道菌群和粪便代谢组学分析。各组大鼠取材前禁食不禁水 12 h, ip 2% 戊巴比妥钠麻醉 ($4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 腹主动脉取血, 静置后 $3\,500 \times g$ 离心 10 min, 分离上清液, 保存于 -80 °C 备用, 取血后迅速脱颈处死, 于冰盘上小心取出全脑组织, 固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 用于 HE 染色。

2.4 酶联免疫吸附测定(ELISA)分析

采用 ELISA 法检测大鼠血清中神经递质 5-HT、DA 和 NE 的含量, 各指标的检测均严格按照相应试剂盒说明书进行。

2.5 组织病理学分析

新鲜大脑组织在 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后, 使用自动旋转切片机将其切割成 4 mm 切片, 并包埋在石蜡中, 通过 HE 染色观察大鼠海马 CA1 和 CA3 区神经元的数目和形态, 并使用 Image J 软件统计 CA1 区和 CA3 区神经元细胞占比。

2.6 菌群16S rDNA扩增子测序及分析

首先对大鼠粪便DNA进行提取,同时采用Nanodrop对DNA进行定量,根据序列中的保守区域设计相应引物,并添加样本特异性Barcode序列,进而对rRNA基因可变区(单个或连续的多个)或特定基因片段进行PCR扩增,扩增产物使用磁珠纯化回收;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;采用VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3和VAHTS DNA Adapters set3-set6 for Illumina对文库进行质检,质检合格使用NovaSeq 6000测序仪进行高通量测序。

通过质量初筛的原始序列按照index和Barcode信息,进行文库和样本划分,并去除barcode序列、去除引物,按照QIIME2 dada2分析流程进行序列去噪;对各样本(组)在不同物种分类学水平的具体组成进行展示,以了解整体概况后进行 α 多样性(Chao1/ACE指数、Simpson/Shannon指数)分析、 β 多样性进行主坐标分析(PCoA)。采用单因素方差分析对各组物种进行门、纲、目、科、属水平的差异统计显著性检验,以进一步挖掘各组间肠道菌群的差异。

2.7 代谢组学

2.7.1 UPLC与MS条件 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide(100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m)色谱柱,液相色谱A相为水相,含25 mmol·L⁻¹乙酸铵和25 mmol·L⁻¹氨水;B相为乙腈。采用梯度洗脱:0~0.5 min, 95% B; 0.5~7.0 min, 95%~65% B; 7.0~8.0 min, 65%~40% B; 8.0~9.0 min, 40% B; 9.0~9.1 min, 40%~95% B; 9.1~12.0 min, 95% B。体积流量0.5 mL·min⁻¹,柱温30℃,进样室温度4℃,进样体积2 μ L。

Orbitrap Exploris 120质谱仪能够在控制软件(Xcalibur 4.4, Thermo)控制下进行一级、二级质谱数据采集。详细参数如下:鞘气流量50 Arb,辅助气体流量15 Arb,毛细管温度320℃,全MS分辨率60 000,MS/MS分辨率15 000,碰撞能量SNCE 20/30/40,喷射电压3.8 kV(正)/-3.4 kV(负)。

2.7.2 代谢组学分析 样品处理后上机检测,针对所得离子产生的质谱峰总离子流色谱图,通过控制软件进行一级、二级质谱数据采集,原始数据经ProteoWizard软件转成mzXML格式后,使用自主编写的R程序包(内核为XCMS)进行峰识别、峰提取、

峰对齐和积分等处理,然后与二级质谱数据库匹配进行物质注释,算法打分的Cutoff值设为0.3。根据代谢物的峰面积,采用差异倍数法(Fold Change, FC)筛选差异代谢物质^[20]。

2.8 粪便代谢标志物与肠道菌群的关联分析

取属水平排名前10的菌属与潜在的粪便差异代谢物进行Spearman相关性分析,得到肠道菌属与差异代谢物之间的关联结果。

2.9 统计学方法

采用SPSS 26.0对数据进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间比较采用Dunnett多重比较事后检验。Origin 2021用于数据可视化处理。

3 结果

3.1 BBC对CUMS抑郁大鼠体质量和抑郁样行为的影响

在整个实验期间,与对照组相比,CUMS处理减缓大鼠体质量的增加速度,BBC和FMT组对CUMS诱导的体质量变化无显著影响。行为学测试的结果表明,与对照组相比,模型组大鼠的糖水偏好率、移动距离和平均移动速度明显降低($P < 0.01$),不动时间明显延长($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠糖水偏好率、移动距离和平均移动速度明显升高($P < 0.05, 0.01$),不动时间明显减少($P < 0.01$)。见图1。

3.2 BBC对CUMS抑郁大鼠血清中神经递质含量的影响

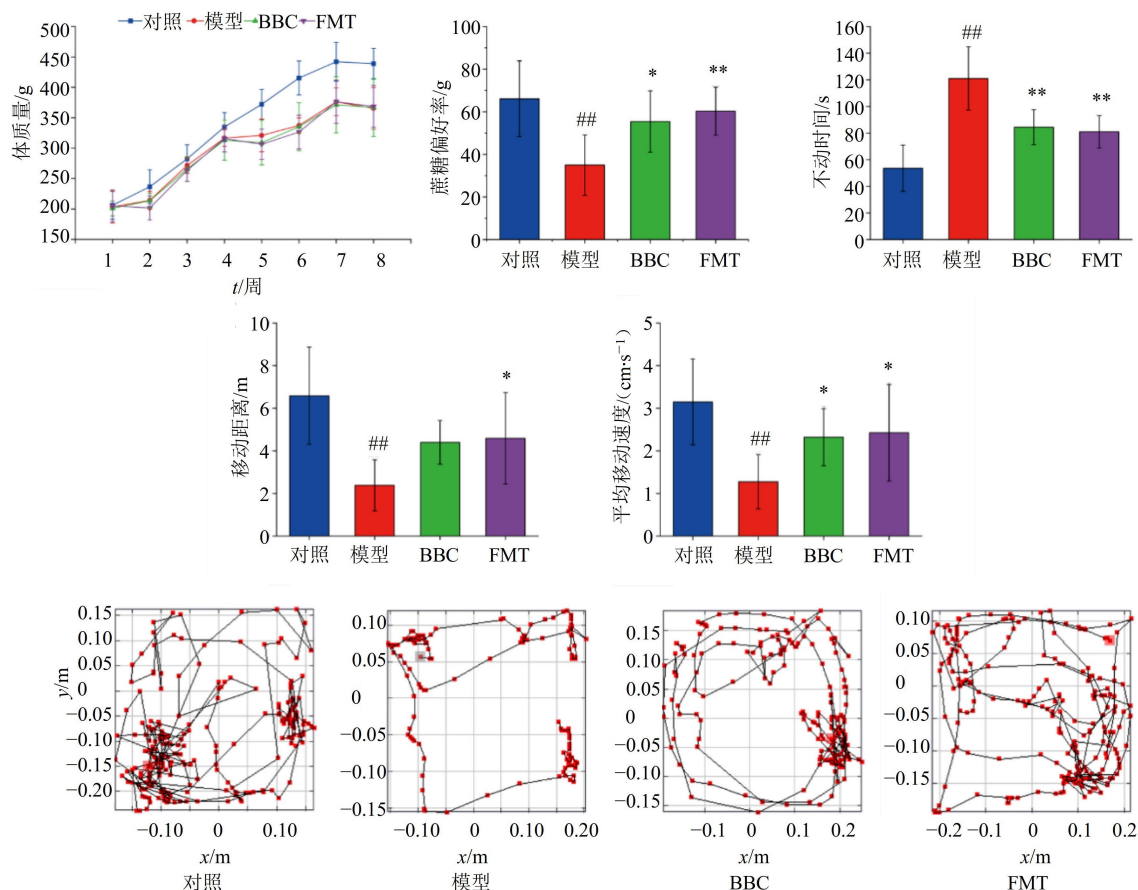
与对照组相比,模型组大鼠血清中5-HT、DA和NE含量均显著下调($P < 0.05, 0.01$);与模型组比较,BBC组和FMT组5-HT含量显著上调($P < 0.05$),DA和NE存在上调的趋势,未呈现显著性差异。见图2。

3.3 BBC对CUMS大鼠海马CA1和CA3区神经元的影响

海马HE染色显示,对照组海马神经元结构完整、排列良好,模型组海马神经元表现为固缩、深染,细胞质出现嗜酸性粒细胞增多,海马CA1和CA3区显示出一定程度的神经元死亡,且排列疏松,形态不规则,数量减少($P < 0.01$);与模型组比较,BBC组大鼠海马CA1和CA3区神经元细胞数量增多($P < 0.01$),排列紧密。见图3。

3.4 BBC对CUMS抑郁大鼠肠道菌群的影响

3.4.1 肠道菌群多样性分析 为了探究BBC对大鼠肠道微生物群的影响,通过Illumina NovaSeq6000

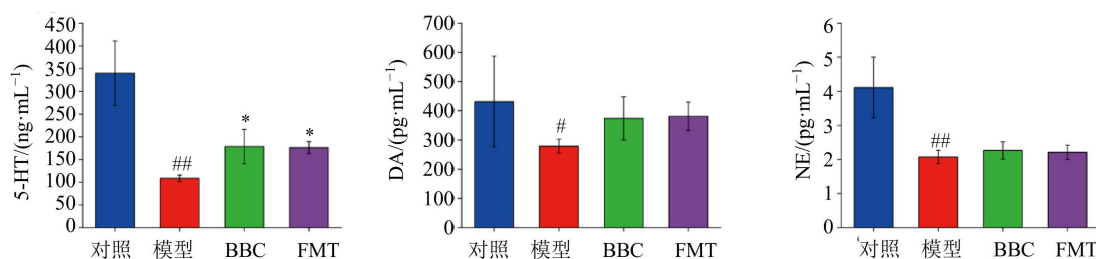


与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ 。

$^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group.

图1 BBC对CUMS抑郁大鼠体重、糖水偏好率、强迫游泳实验不动时间和旷场实验运动距离、平均运动速度、运动轨迹的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Fig. 1 Effects of BBC on body mass, sugar water preference rate, immobility time in forced swimming experiment, distance, average speed, and trajectory in open field experiment of CUMS-induced rats ($\bar{x} \pm s, n=9$)



与对照组比较: $^{#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ 。

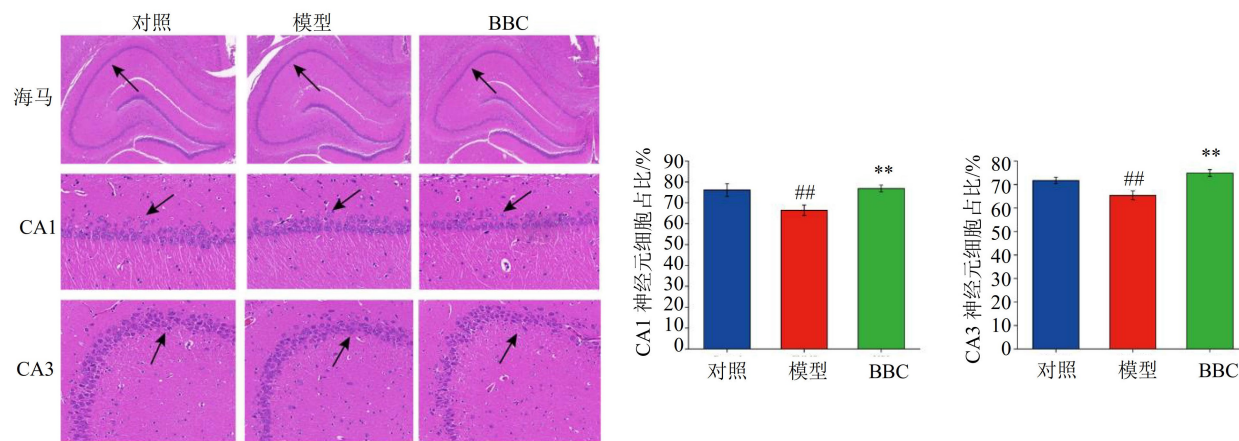
$^{#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ vs model group.

图2 BBC对CUMS抑郁大鼠血清中5-HT、DA和NE的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Effect of BBC on 5-HT, DA, and NE in serum of CUMS-induced depression rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

测序仪对大鼠粪便样本16S rDNA V3~V4区域进行高通量测序,见图4。韦恩图分析发现,对照组、模型组和BBC组共有的物种为677个,对照组特有的物种为1 117个,模型组特有的物种为1 220个,BBC组特有的物种有946个。各组样本的稀释曲线区域平坦,表明本实验样本的测序数量合理,

所获得的群落能反映大多数实际物种。基于 β 多样性进行PCoA,用以比较不同样本之间的物种多样性。对照组和模型组的相距较远,完全分离,说明CUMS诱导的抑郁大鼠肠道微生物群结构发生了显著变化,相比于模型组,BBC组向对照组偏移,说明益生菌治疗减弱了CUMS诱导的大鼠的肠道微



箭头-各组大鼠脑中神经元的变化,包括数量减少、固缩、深染和形态不规则;与对照组比较:## $P < 0.01$;与模型组比较:** $P < 0.01$ 。
Arrow-changes in neurons, including shrinkage, deep staining, irregular morphology, and reduced numbers; ## $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group.

图3 BBC对大鼠脑组织的病理学影响($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Pathological effects of BBC on rat brain tissue($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

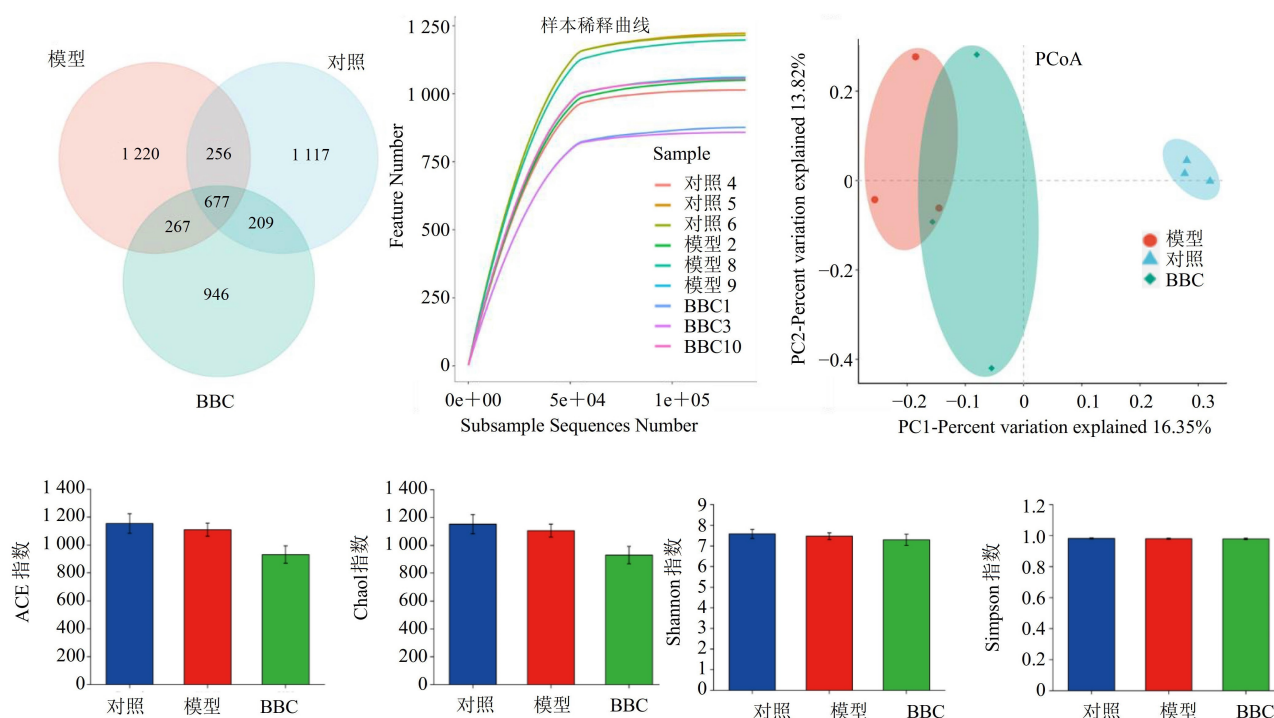


图4 BBC对CUMS抑郁大鼠肠道微生物群多样性的影响

Fig. 4 Effect of BBC on diversity of gut microbiota in CUMS-induced depression rats

生物群的变化。

α 多样性反映的是单个样品物种丰度及物种多样性,通常包括ACE指数、Chao1指数、Shannon指数、Simpson指数4种衡量指标。ACE指数和Chao1指数衡量物种丰度即物种数量的多少;Shannon指数和Simpson指数用于衡量物种多样性,其数值越大,说明样品的物种多样性越高。各组大鼠ACE、Chao1、Shannon、Simpson指数无明显差异($P >$

0.05),表明所有样本的肠道微生物丰度及多样性无明显差异,是可供比较的^[21]。

3.4.2 肠道微生物组成分析 对照组、模型组和BBC组大鼠在门、纲、目、科、属水平上丰度排名前10的物种见图5。门水平上,各组大鼠肠道微生物区系主要由拟杆菌门(Bacteroidota)、厚壁菌门(Firmicutes)和脱硫杆菌门(Desulfobacterota)组成;纲水平上,各组大鼠肠道微生物区系主要由

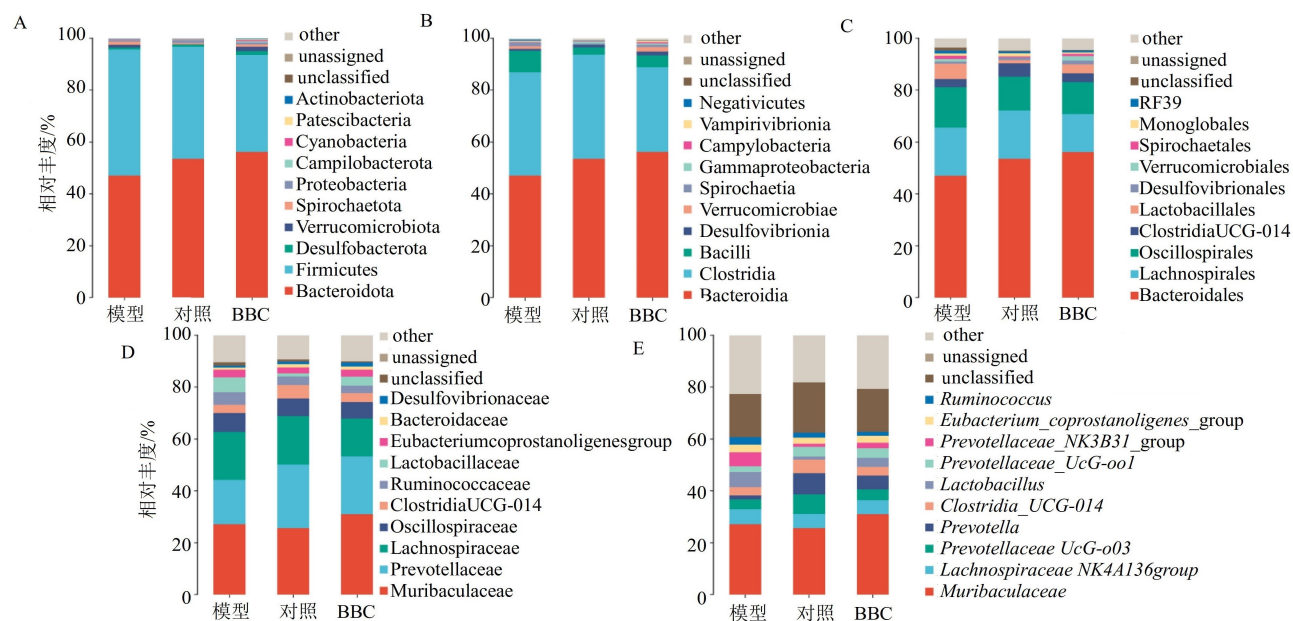


图5 各组大鼠肠道微生物在门(A)、纲(B)、目(C)、科(D)、属(E)水平菌群分布变化

Fig. 5 Changes in distribution of gut microbiota at phylum (A), class (B), order (C), family (D), and genus (E) levels of rats in each group

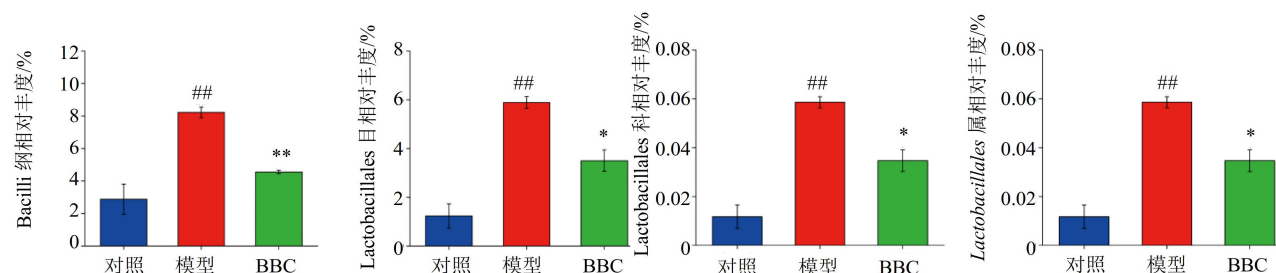
Bacteroidia、Clostridia、Bacilli 组成;目水平上,各组大鼠肠道微生物区系主要由 Bacteroidales、Lachnospirales、Oscillospirales 组成;科水平上,各组大鼠肠道微生物区系主要由 Muribaculaceae、Prevotellaceae、Lachnospiraceae 组成,属水平上,各组大鼠肠道微生物区系主要由 Muribaculaceae、Lachnospiraceae_NK4A136_group、Prevotellaceae_UCG-003 组成。

3.4.3 差异菌群分析 各组大鼠在门、纲、目、科、属水平上主要差异菌群组间比较分析见图6。门水平上未观察到有显著变化的菌群。与对照组相比,模型组大鼠肠道中 Bacilli 纲、Lactobacillales 目、Lactobacillaceae 科和 *Lactobacillus* 属相对丰度显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,BBC 组大鼠肠道中

Bacilli 纲、Lactobacillales 目、Lactobacillaceae 科和 *Lactobacillus* 属相对丰度显著降低($P < 0.05, 0.01$)。

3.5 BBC对CUMS抑郁大鼠粪便和血清代谢物质的影响

采用FC对代谢物质进行筛选,为了呈现更好的可视化结果,对FC值取log2对数作图。粪便代谢组学的差异代谢物见图7-A,与对照组比较,模型组中上调排名前10的差异代谢物质分别是1-羟基-2-萘甲酸(1-hydroxy-2-naphthoic acid)、(-)-表没食子酸儿茶素[(-)-epigallocatechin]、甘草异黄酮A(glycyrrhizaisoflavone A)、N,N-二甲基鸟苷(N,N-dimethylguanosine)、衣康酸(itaconic acid)、N-乙酰组胺(N-acetylhistamine)、wistin、N-乙酰-L-组氨酸(N-



与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ 。

$^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ vs model group.

图6 BBC对CUMS抑郁大鼠纲、目、科和属水平差异菌群的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 6 Effect of BBC on differential microbial communities at levels of class, order, family, and genus in CUMS-induced depression rats($\bar{x} \pm s, n=3$)

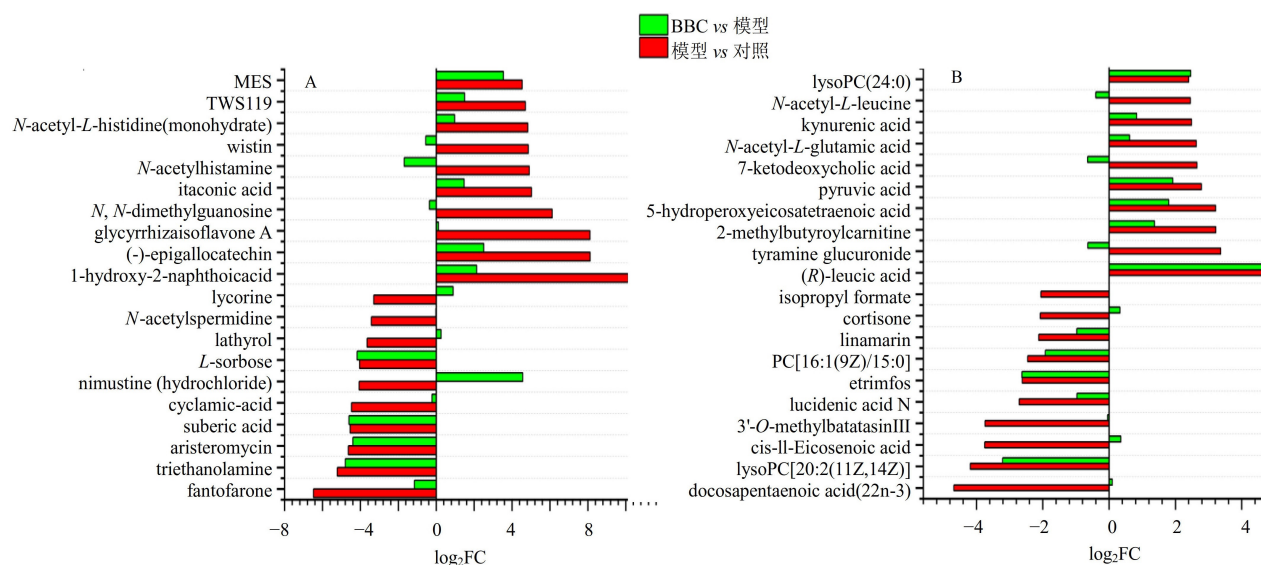


图7 大鼠粪便(A)和血清(B)中差异代谢物
Fig. 7 Differential metabolites in feces (A) and serum (B) of rats

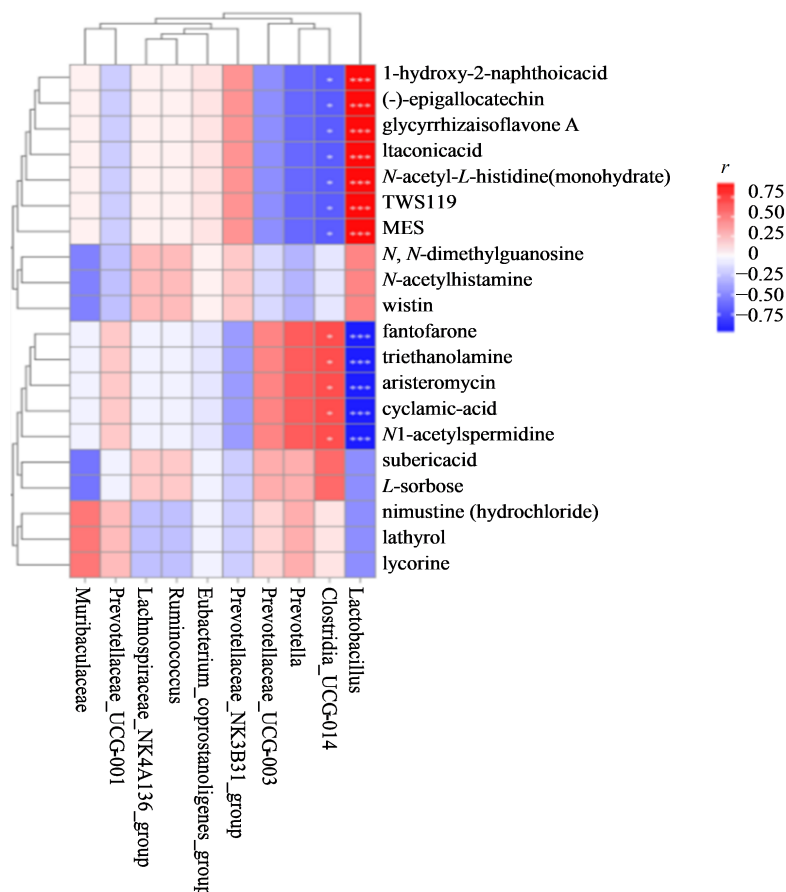
acetyl-L-histidine)、TWS119和MES,经过BBC治疗后,这些代谢物含量下调,接近正常水平;与对照组比较,模型组中下调排名前10的差异代谢物质分别是 fantofarone、三乙醇胺(triethanolamine)、芒霉素(aristeromycin)、辛二酸(suberic acid)、环己基氨基磺酸(cyclamic acid)、盐酸尼莫司汀(nimustine hydrochloride)、L-山梨糖(L-sorbose)、千金子二萜醇(lathyrol)、N-乙酰亚精胺(N-acetylspermidine)、石蒜碱(lycorine),经过BBC治疗后,代谢物 fantofarone、环己基氨基磺酸、千金子二萜醇、N-乙酰亚精胺的含量上调,且接近正常水平。

血清代谢组学的差异代谢物见图7-B,与对照组比较,模型组中上调排名前10的差异代谢物质分别是(R)-亮氨酸[(R)-leucic acid]、酪胺葡萄糖醛酸(tyramine glucuronide)、2-甲基丁酰肉碱(2-methylbutyrylcarnitine)、5-羟过氧化二十碳四烯酸(5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid)、丙酮酸(pyruvic acid)、7-ketodeoxycholic acid、N-乙酰-L-谷氨酸(N-acetyl-L-glutamic acid)、犬尿喹啉酸(kynurenic acid)、N-乙酰-L-亮氨酸(N-acetyl-L-leucine)、lysoPC(24:0);经过BBC治疗后,代谢物 lysoPC(24:0)、7-ketodeoxycholic acid、N-乙酰-L-谷氨酸、犬尿喹啉酸、N-乙酰-L-亮氨酸的含量显著下调,且接近正常水平。与对照组比较,模型组中显著下调的排名前10的差异代谢物质分别是二十二碳五烯酸(22n-3)[docosapentaenoic acid(22n-3)]、LysoPC[20:2(11Z,14Z)]、顺式-11-二十碳烯酸(cis-11-eicosenoic acid)、3'-O-甲基山药素

III(3'-O-methylbatatasin III)、赤芝酸N(lucidenic acid N)、乙噻硫磷(etrimfos)、PC[16:1(9Z)/15:0]、亚麻苦苷(linamarin)、可的松(cortisone)、甲酸异丙酯(isopropyl formate)。经过BBC治疗后,代谢物二十二碳五烯酸(22n-3)、顺式-11-二十碳烯酸、3'-O-甲基山药素III、赤芝酸N、可的松、甲酸异丙酯的含量上调,且接近正常水平。

3.6 肠道菌群与粪便代谢组学的关联分析

本研究为了探索肠道菌群分布和肠道代谢物之间是否存在某种依存关系,进一步采用了Spearman相关性分析来探寻肠道菌群和肠道差异代谢物之间的关联性,结果表明肠道差异菌群与肠道差异代谢物之间存在显著相关性,见图8。BBC调节的关键菌属 *Lactobacillus* 与肠道代谢物1-羟基-2-萘甲酸、(-)-表没食子酸儿茶素、甘草异黄酮A、衣康酸、N-乙酰组胺、TWS119和MES呈显著正相关($P < 0.001$);与肠道代谢物 fantofarone、三乙醇胺、芒霉素、环己基氨基磺酸、N-乙酰亚精胺呈显著负相关($P < 0.001$)。另外,由图5-E可知,与对照组比较, *Clostridia_UCG-014* 属在模型组中相对丰度明显下降,在本次关联分析中发现与上述代谢物存在显著的相关性,与1-羟基-2-萘甲酸、(-)-表没食子酸儿茶素、甘草异黄酮A、衣康酸、N-乙酰组胺、TWS119和MES呈显著正相关($P < 0.05$),与 fantofarone、三乙醇胺、芒霉素、环己基氨基磺酸、N-乙酰亚精胺呈显著负相关($P < 0.05$),表明 *Clostridia_UCG-014* 属在抑郁大鼠的肠道代谢物的调节中同样发挥着重要作用。



r -Spearman 相关性系数, 介于 $[-1, 1]$ 之间, $r < 0$ 为负相关, $r > 0$ 为正相关; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

r -Spearman correlation coefficient is between $[-1, 1]$, with $r < 0$ indicating a negative correlation and $r > 0$ indicating a positive correlation; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

图8 肠道差异菌群与肠道差异代谢物的相关性热图

Fig. 8 Correlation heatmap between gut differential microbiota and differential metabolites in intestine

3.7 血清代谢物通路富集分析

采用 OmicShare (<https://www.omicshare.com/>) 在线生信分析平台中的 KEGG 富集分析模块, 将血清差异代谢物进行代谢通路分析, 见图9。结果表明, 影响最显著的4个代谢通路分别是不饱和脂肪酸的生物合成 (biosynthesis of unsaturated fatty acids)、酪氨酸代谢 (tyrosine metabolism)、丁酸代谢 (butanoate metabolism) 和烟酸和烟酰胺代谢 (nicotinate and nicotinamide metabolism)。

4 讨论

在过去的10年中, 青少年出现抑郁或焦虑症状的比率不断上升, 约有31%的青少年心理健康障碍筛查呈阳性^[22], 这些心理健康问题常常被忽视, 难以得到有效的治疗^[23]。本研究基于前期青少年抑郁症临床研究结果, 发现两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、短双歧杆菌和嗜热链球菌具有潜在的抗抑郁作用, 本实验证实了BBC具有改善大鼠抑郁行为的作用。

CUMS 广泛被用于建立慢性抑郁动物模型, 通过模拟外部应激源, 如禁食禁水、冰水游泳等, 经过数周刺激使动物机体功能障碍, 表现出紧张、焦虑等症状^[24]。作为判断大鼠抑郁行为变化的指标, 行为学实验用于评估模型动物的抑郁、焦虑行为^[25], 糖水偏好实验反映大鼠特异性快感缺失, 旷场实验反映大鼠的探索能力和好奇程度, 强迫游泳实验的不动时间反映大鼠的绝望程度^[26-27]。本实验, 通过建立CUMS诱导的抑郁症大鼠模型, 发现BBC能改善抑郁大鼠糖水偏好、强迫游泳、旷场实验的表现, 表明BBC能够有效改善应激导致的快感缺失, 增强大鼠的自主活动性和好奇心, 同时增加其在绝望环境中的求生欲, 从而缓解抑郁症状。

神经影像学研究发现, 成人产生的海马神经元是情绪控制和抗抑郁功效所必需的, 而抑郁症患者大脑海马区域体积萎缩, 神经元数量减少^[28-29], 且CA1和CA3区是最常受损的区域之一, 其神经元的异常活动与抑郁症状密切相关^[30-31]。本实验证实,

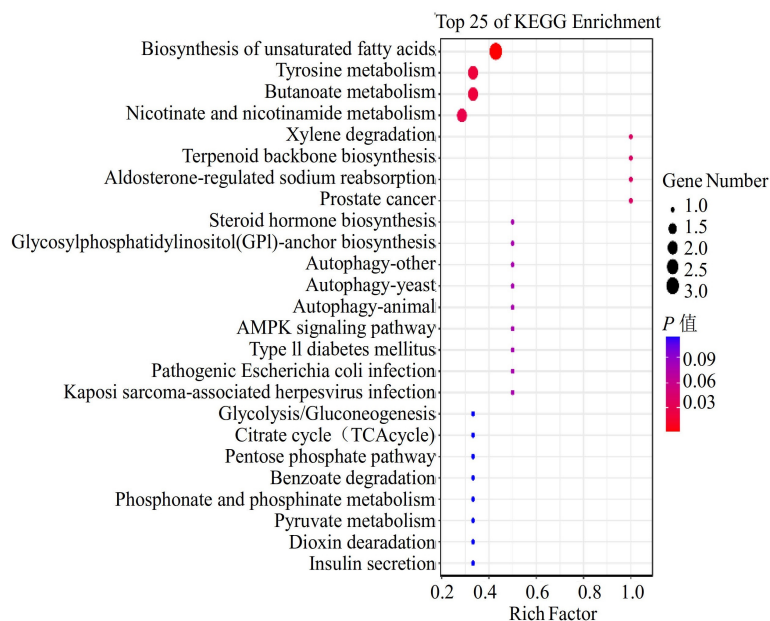


图9 血清差异代谢物KEGG信号通路富集分析

Fig. 9 Enrichment analysis of KEGG signaling pathway, a serum differential metabolite.

BBC可改善海马CA1和CA3区的神经元损伤,促进神经元细胞的修复和再生,有效改善应激导致的海马区和前额叶层的病理变化,缓解了神经元结构和功能的损伤。5-HT、DA和NE是3种在体内发挥重要作用的神经递质,在情绪调节、认知能力、心理和睡眠等方面起着重要作用,与抑郁症的发生发展密切相关^[32]。BBC能显著升高大鼠血清中5-HT的水平,但是对DA和NE的调节作用不明显,可能因为样本量不够大或者动物个体之间的生物学差异导致的,需要后续实验的进一步验证。

脑-肠-微生物群轴(BGMA)是指大脑、肠道和肠道微生物群之间的双向交流网络。该轴通过调节代谢产物和神经递质的水平,以及影响免疫系统,在抑郁症的发生和进展中发挥着关键作用^[33-34]。本研究应用16S rDNA扩增子测序发现,模型组大鼠与对照组大鼠的肠道微生物群显著分离,说明CUMS大鼠肠道微生物群落结构发生了改变,出现一定程度的菌群失调,主要为Bacilli纲、Lactobacillales目、Lactobacillaceae科和Lactobacillus属显著升高,Lactobacillus作为一种益生菌,多项临床研究证实其有助于提高患者睡眠质量和认知水平,改善抑郁和焦虑症状^[35-37]。BBC可逆转CUMS导致的Lactobacillus相对丰度应激性升高,说明其缓解了CUMS大鼠的抑郁样症状。

粪便代谢物被认为是肠道菌群和宿主共代谢的产物,它不仅可以反映肠道菌群的状态,而且在

肠道微生物与宿主之间起着桥梁作用;血液是人体最重要的生物体液,血液样本中的内源性代谢物在含量上发生的微小变化,可能会及时反映机体在某种病理或生理下的代谢情况^[38-39]。采用UHPLC-OE-MS非靶向代谢组学分析发现,粪便代谢物中,BBC干预后,抑郁症大鼠中显著回调的前3种代谢物为1-羟基-2-萘甲酸、甘草黄酮A和N-乙酰组胺。1-羟基-2-萘甲酸是微生物对菲进行生物降解产生的一种异生代谢物^[40],其衍生物1-羟基-2-萘甲酸甲酯已被证明可通过抑制核因子- κ B(NF- κ B)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)和p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径抑制脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞炎症反应^[41]。BBC组的1-羟基-2-萘甲酸显著降低,其原因可能是补充的益生菌具有良好的抗炎作用^[42],改善了抑郁症大鼠的炎症反应。甘草黄酮A具有良好的抗氧化、抗炎和抗微生物的作用^[43-44],能通过抑制5-HT再摄取,产生抗抑郁作用^[45]。BBC干预后甘草黄酮A含量接近正常水平。N-乙酰组胺作为组胺的代谢产物之一,调节组胺H3受体(H3R)和组胺H1受体(H1R)缓解抑郁样行为^[46-48]。BBC干预后,N-乙酰组胺的含量显著降低,提示本研究中的益生菌可能通过影响组胺的代谢和释放调节抑郁症的发生进展。进一步根据肠道微生物与差异代谢物的关联分析结果可知,肠道菌群与差异代谢物之间存在非常密切的关系,尤其是Lactobacillus,猜测BBC可能通过Lactobacillus菌群

调控,调节相关代谢物发挥抗抑郁样作用。

在血清代谢物中,BBC干预后,显著回调的前3种代谢物分别是二十二碳五烯酸、顺式-11-二十碳烯酸和3'-O-甲基巴塔氨酸III,进一步采用KEGG通路富集显示了4条最关键的代谢途径——不饱和脂肪酸的生物合成(biosynthesis of unsaturated fatty acids)、酪氨酸代谢(tryosine metabolism)、丁酸代谢(butanoate metabolism)和烟酸和烟酰胺代谢(nicotinate and nicotinamide metabolism)。不饱和脂肪酸缺乏会导致血清素功能失效,加重抑郁样行为^[49-50];二十二碳五烯酸作为 ω -3多不饱和脂肪酸,其补充剂已被用于治疗抑郁症^[51],BBC能提高大鼠血清中二十二碳五烯酸含量,接近正常水平,表明BBC可能通过调控不饱和脂肪酸的生物合成,提高血清中 ω -3多不饱和脂肪酸的含量发挥抗抑郁作用。然而,本研究分析并未发现肠道菌群和血清代谢物存在显著的关联性,这可能与本研究的样本量受限有关。事实上,研究表明,缺乏不饱和脂肪酸摄入的小鼠,成年后表现明显的社交障碍、认知功能下降以及抑郁行为,且粪便中*Lactobacillus*属丰度升高^[52]。因此,未来的研究将扩大样本量,并采用更为敏感的多变量分析技术来探索肠道菌群与血清代谢产物之间的潜在关联。如有可能,结合多组学数据(如蛋白质组学和转录组学),为揭示这项联系提供更全面的理解。

本研究基于前期临床调研,发现双歧杆菌属和链球菌属为存在于大学生抑郁症患者和正常人体内的差异菌属,且具有潜在的抗抑郁作用。因此,采用16S rDNA肠道菌群测序和非靶向代谢组学,探讨了由双歧杆菌属和链球菌属构成的BBC对CUMS诱导的抑郁大鼠的抗抑郁作用及其作用机制。结果显示该益生菌组合可有效缓解大鼠的抑郁症状,升高血清中5-HT、DA和NE的水平,增加海马神经元的数量,缓解神经元损伤,16S rDNA测序和代谢组学研究发现BBC能有效改善抑郁大鼠肠道菌群的失调,可能通过影响代谢物质的变化,调控代谢途径来发挥抗抑郁作用。本研究结果进一步证实了益生菌对抑郁患者情绪改善机制,为开发防治抑郁症的益生菌药物提供了科学参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Collaborators C I M D. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic [J]. Lancet, 2021, 398(10312): 1700-1712.
- [2] Patten S B, Williams J V A, Lavorato D H, et al. Why is major depression prevalence not changing? [J]. J Affect Disord, 2016, 190: 93-97.
- [3] Malhi G S, Mann J J. Depression [J]. Lancet, 2018, 392(10161): 2299-2312.
- [4] Paul B, Usha V K. Prevalence and predictors of depression among adolescents [J]. Indian J Pediatr, 2021, 88(5): 441-444.
- [5] Kupfer D J, Frank E, Phillips M L. Major depressive disorder: New clinical, neurobiological, and treatment perspectives [J]. Lancet, 2012, 379(9820): 1045-1055.
- [6] Socała K, Doboszevska U, Szopa A, et al. The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and neurological disorders [J]. Pharmacol Res, 2021, 172: 105840.
- [7] Nishida K, Sawada D, Kuwano Y, et al. Health benefits of *Lactobacillus gasseri* CP2305 tablets in young adults exposed to chronic stress: A randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. Nutrients, 2019, 11(8): 1859.
- [8] Zhu R Z, Fang Y L, Li H Y, et al. Psychobiotic *Lactobacillus plantarum* JYLP-326 relieves anxiety, depression, and insomnia symptoms in test anxious college via modulating the gut microbiota and its metabolism [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1158137.
- [9] 王刚,田培郡,赵建新,等.短双歧杆菌CCFM1025可缓解由轻度慢性不可预知压力引起的抑郁症状和相关肠道菌群失调[A]//第十五届益生菌与健康国际研讨会摘要集[C].南京:第十五届益生菌与健康国际研讨会摘要集,2020.
Wang G, Tian P J, Zhao J X, et al. *Bifidobacterium breve* CCFM1025 alleviates the symptom of depression and related microbiota dysbiosis induced by chronic unpredictable mild stress [A]. Summary of the 15th International Symposium on Probiotics and Health [C] Nanjing: Summary Collection of the 15th International Symposium on Probiotics and Health, 2020.
- [10] Yoda K, Harata G, Sato M, et al. Effect of probiotic *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 supplementation on psychosocial stress using a sub-chronic and mild social defeat stress in mice [J]. Nutrients, 2022, 14(5): 970.
- [11] Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects [J]. Br J Nutr, 2011, 105(5): 755-764.
- [12] Wang P, Wu P F, Wang H J, et al. Gut microbiome-derived ammonia modulates stress vulnerability in the host [J]. Nat Metab, 2023, 5(11): 1986-2001.

- [13] Tian P J, Zou R Y, Wang L Y, et al. Multi-Probiotics ameliorate Major depressive disorder and accompanying gastrointestinal syndromes *via* serotonergic system regulation [J]. J Adv Res, 2023, 45: 117-125.
- [14] Nikolova V L, Cleare A J, Young A H, et al. Acceptability, tolerability, and estimates of putative treatment effects of probiotics as adjunctive treatment in patients with depression: A randomized clinical trial [J]. JAMA Psychiatry, 2023, 80(8): 842-847.
- [15] Huang L, Lv X, Ze X L, et al. Combined probiotics attenuate chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like and anxiety-like behaviors in rats [J]. Front Psychiatry, 2022, 13: 990465.
- [16] Zhang M, Li A Q, Yang Q F, et al. Matrine alleviates depressive-like behaviors *via* modulating microbiota-gut-brain axis in CUMS-induced mice [J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 145.
- [17] 宫文霞, 宋亚鹏, 王艳丽, 等. 基于肝脏代谢组学的当归"活血解郁"作用机制研究 [J]. 中草药, 2023, 54(19): 6314-6322.
Gong W X, Song Y P, Wang Y L, et al. Mechanism of *Angelicae Sinensis* Radix on anti-depression and activating blood based on liver metabolomics [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(19): 6314-6322.
- [18] Li H N, Xiang Y J, Zhu Z M, et al. Rifaximin-mediated gut microbiota regulation modulates the function of microglia and protects against CUMS-induced depression-like behaviors in adolescent rat [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 254.
- [19] 陈可琢, 陈实, 任洁贻, 等. 茯苓酸性多糖抗抑郁作用及其调节神经递质和NLRP3通路机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19): 5088-5095.
Chen K Z, Chen S, Ren J Y, et al. Antidepressant effect of acidic polysaccharides from *Poria* and their regulation of neurotransmitters and NLRP3 pathway [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(19): 5088-5095.
- [20] Chen Q, Liang X, Wu T Z, et al. Integrative analysis of metabolomics and proteomics reveals amino acid metabolism disorder in sepsis [J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 123.
- [21] Gu F, Wu Y Y, Liu Y, et al. *Lactobacillus casei* improves depression-like behavior in chronic unpredictable mild stress-induced rats by the BDNF-TrkB signal pathway and the intestinal microbiota [J]. Food Funct, 2020, 11(7): 6148-6157.
- [22] Lattie E G, Adkins E C, Winquist N, et al. Digital mental health interventions for depression, anxiety, and enhancement of psychological well-being among college students: Systematic review [J]. J Med Internet Res, 2019, 21(7): e12869.
- [23] Bernhardsdóttir J, Vilhjálmsson R. Psychological distress among university female students and their need for mental health services [J]. J Psychiatr Ment Health Nurs, 2013, 20(8): 672-678.
- [24] Xie J Q, Li Y H, Liang Y L, et al. Integration of non-targeted metabolomics with network pharmacology deciphers the anxiolytic mechanisms of Platycladi *Semen* extracts in CUMS mice [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 315: 116571.
- [25] Arjmand S, Wegener G, Landau A M, et al. Tips and traps for behavioural animal experimentation [J]. Acta Neuropsychiatr, 2022, 34(5): 240-252.
- [26] Yang Y Q, Zhao S Z, Yang X P, et al. The antidepressant potential of *Lactobacillus casei* in the postpartum depression rat model mediated by the microbiota-gut-brain axis [J]. Neurosci Lett, 2022, 774: 136474.
- [27] Feng S Y, Meng C, Liu Y Y, et al. *Bacillus licheniformis* prevents and reduces anxiety-like and depression-like behaviours [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2023, 107(13): 4355-4368.
- [28] Roddy D W, Farrell C, Doolin K, et al. The hippocampus in depression: More than the sum of its parts? advanced hippocampal substructure segmentation in depression [J]. Biol Psychiatry, 2019, 85(6): 487-497.
- [29] Eisch A J, Petrik D. Depression and hippocampal neurogenesis: A road to remission? [J]. Science, 2012, 338(6103): 72-75.
- [30] Wang H, Tan Y Z, Mu R H, et al. Takeda G protein-coupled receptor 5 modulates depression-like behaviors *via* hippocampal CA3 pyramidal neurons afferent to dorsolateral septum [J]. Biol Psychiatry, 2021, 89(11): 1084-1095.
- [31] Strandberg J, Gustafsson B. Critical and complex role of N-methyl-D-aspartate receptors in long-term depression at CA3-CA1 synapses in the developing hippocampus [J]. Neuroscience, 2011, 192: 54-66.
- [32] Hamon M, Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2013, 45: 54-63.
- [33] Loh J S, Mak W Q, Tan L K S, et al. Microbiota-gut-brain axis and its therapeutic applications in neurodegenerative diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 37.
- [34] Simpson C A, Diaz-Arteche C, Eliby D, et al. The gut microbiota in anxiety and depression - A systematic review [J]. Clin Psychol Rev, 2021, 83: 101943.
- [35] Rudzki L, Ostrowska L, Pawlak D, et al. Probiotic *Lactobacillus plantarum* 299v decreases kynurenine

- concentration and improves cognitive functions in patients with major depression: A double-blind, randomized, placebo controlled study [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2019, 100: 213-222.
- [36] Slykerman R F, Hood F, Wickens K, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in pregnancy on postpartum symptoms of depression and anxiety: A randomised double-blind placebo-controlled trial [J]. *EBioMedicine*, 2017, 24: 159-165.
- [37] Ho Y T, Tsai Y C, Kuo T B J, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 on depressive symptoms and sleep quality in self-reported insomniacs: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial [J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2820.
- [38] James E L, Parkinson E K. Serum metabolomics in animal models and human disease [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2015, 18(5): 478-483.
- [39] Zhang D D, Li H J, Zhang H R, et al. *Poria cocos* water-soluble polysaccharide modulates anxiety-like behavior induced by sleep deprivation by regulating the gut dysbiosis, metabolic disorders and TNF- α /NF- κ B signaling pathway [J]. *Food Funct*, 2022, 13(12): 6648-6664.
- [40] 张丹, 李兆格, 包新光, 等. 细菌降解萘、菲的代谢途径及相关基因的研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2010, 26(6): 726-734.
- Zhang D, Li Z G, Bao X G, et al. Recent advances in bacterial biodegradation of naphthalene, phenanthrene by bacteria: A review [J]. *Chin J Biotechnol*, 2010, 26(6): 726-734.
- [41] Zhang J Y, Jin H, Wang G F, et al. Methyl-1-hydroxy-2-naphthoate, a novel naphthol derivative, inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in macrophages via suppression of NF- κ B, JNK and p38 MAPK pathways [J]. *Inflamm Res*, 2011, 60(9): 851-859.
- [42] Li S C, Hsu W F, Chang J S, et al. Combination of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Shows a Stronger Anti-Inflammatory Effect than Individual Strains in HT-29 Cells [J]. *Nutrients*, 2019, 11(5): 969.
- [43] 张福欣, 宋佳烜, 刘晓东, 等. 甘草黄酮抗氧化及免疫活性 [J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(6): 1180-1183.
- Zhang F X, Song J X, Liu X D, et al. Antioxidation and immune activity of licorice flavonoids [J]. *Chin J Vet Sci*, 2019, 39(6): 1180-1183.
- [44] 曹雅琦, 魏丹丹, 张森, 等. 苦参异戊烯基黄酮与甘草黄酮联用体外抑菌活性评价及抗小鼠乳腺炎作用研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(3): 331-338.
- Cao Y Q, Wei D D, Zhang S, et al. Bacteriostasis of prenylated flavonoids from *Sophora flavescens* and flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* alone and their combination on *Staphylococcus aureus* and experimental mastitis [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2020, 36(3): 331-338.
- [45] Ofir R, Tamir S, Khatib S, et al. Inhibition of serotonin re-uptake by licorice constituents [J]. *J Mol Neurosci*, 2003, 20(2): 135-140.
- [46] Hersey M, Samaranayake S, Berger S N, et al. Inflammation-induced histamine impairs the capacity of escitalopram to increase hippocampal extracellular serotonin [J]. *J Neurosci*, 2021, 41(30): 6564-6577.
- [47] Qian H, Shu C, Xiao L, et al. Histamine and histamine receptors: Roles in major depressive disorder [J]. *Front Psychiatry*, 2022, 13: 825591.
- [48] Cheng L, Xu C L, Wang L, et al. Histamine H₁ receptor deletion in cholinergic neurons induces sensorimotor gating ability deficit and social impairments in mice [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1142.
- [49] Sublette M E, Galfalvy H C, Hibbeln J R, et al. Polyunsaturated fatty acid associations with dopaminergic indices in major depressive disorder [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2014, 17(3): 383-391.
- [50] Song C, Manku M S, Horrobin D F. Long-chain polyunsaturated fatty acids modulate interleukin-1 β -induced changes in behavior, monoaminergic neurotransmitters, and brain inflammation in rats [J]. *J Nutr*, 2008, 138(5): 954-963.
- [51] Okereke O I, Vyas C M, Mischoulon D, et al. Effect of long-term supplementation with marine omega-3 fatty acids vs placebo on risk of depression or clinically relevant depressive symptoms and on change in mood scores: A randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2021, 326(23): 2385-2394.
- [52] Robertson R C, Seira Oriach C, Murphy K, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids critically regulate behaviour and gut microbiota development in adolescence and adulthood [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 59: 21-37.

[责任编辑 兰新新]