

• 药理与临床 •

慢性温和不可预知应激抑郁模型大鼠粪便¹H-NMR代谢组学研究

田俊生, 史碧云, 冯光明, 秦雪梅*

山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘要: 目的 采用¹H-NMR代谢组学技术研究慢性温和不可预知应激(CUMS)抑郁模型大鼠粪便中内源性代谢产物的变化规律, 寻找潜在的生物标志物。方法 大鼠分成模型组与对照组。采用CUMS程序对模型组大鼠进行为期4周的造模, 造模结束后收集大鼠粪便。应用¹H-NMR技术及多元统计分析方法分析大鼠粪便提取物中内源性代谢产物的变化规律。结果 模型组与对照组大鼠的行为学指标差别明显, 表明CUMS大鼠抑郁模型复制成功。在大鼠粪便的¹H-NMR图谱中可以指出30种内源性代谢产物, 模型组中谷氨酰胺、乳酸、天冬氨酸的量明显增加, 而尿嘧啶、酪氨酸、苯丙氨酸的量明显降低, 且与对照组相比差异显著($P < 0.05, 0.01$)。结论 通过研究CUMS抑郁模型大鼠粪便中内源性代谢产物的变化规律, 阐明与抑郁症有关的潜在生物标志物, 为抑郁症的发病机制及临床诊断研究提供实验依据。

关键词: 代谢组学; 粪便; 抑郁症; 慢性温和不可预知应激; 内源性代谢物; ¹H-NMR

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)22-3170-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.22.014

¹H-NMR metabonomic study on fecal of chronic unpredicted mild stress model of depression in rats

TIAN Jun-sheng, SHI Bi-yun, FENG Guang-ming, QIN Xue-mei

Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine of Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To obtain the potential biomarkers of chronic unpredictable mild stress (CUMS) rats, the change of endogenous metabolites in the faeces of CUMS rats was analyzed using ¹H-NMR coupled with metabonomics. **Methods** CUMS procedure was conducted for four weeks, CUMS rat model was duplicated, and the faeces of rats was collected at the end of the procedure. The change of endogenous metabolites in faeces was analyzed using ¹H-NMR coupled with multivariate statistical analysis. **Results** The PLS-DA scores plot demonstrated that behavior indexes of rats in the control group were significantly different from these of rats in CUMS group, suggesting the CUMS model of depression in rats was prepared successfully. Thirty metabolites were identified in the ¹H-NMR spectra of faeces, the concentration of glutamine, lactate, and aspartate was increased while that of β -glucose, uracil, tyrosine, and phenylalanine was decreased in CUMS model group with the significant difference compared with the control group ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** By researching the change of endogenous metabolites in the faeces of CUMS rats, the potential biomarkers in the faeces of CUMS rats are picked up to lay the foundation for the study on the depression pathogenesis and clinical diagnosis.

Key words: metabonomics; faeces; depression; chronic unpredicted mild stress; endogenous metabolites; ¹H-NMR

抑郁症是以显著而持久的情绪低落、活动能力减退、思维与认知功能迟缓为主要临床特征的情感性精神障碍^[1]。目前, 抑郁症的临床诊断标准缺乏客观的实验室检查手段, 仅仅依据病史、临床症状和病程制定的现行诊断标准带有一定的主观性, 是

该病症临床诊断比较混乱、诊断率和治疗率偏低的关键。寻找可成为抑郁症诊断标准的生物标志物, 探索准确、客观的临床诊断方法是阐明抑郁症发病机制、提高抗抑郁药物临床疗效的有效途径之一。

代谢组学是研究机体代谢产物变化的一种新的

收稿日期: 2013-03-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173366, 81102833); 山西省基础研究项目(2012021031-2); 国家“重大新药创制”科技重大专项课题(2012ZX09103201-035); 国家国际科技合作计划项目(2011DFA32630)

作者简介: 田俊生(1980—), 男, 内蒙古人, 博士, 讲师, 研究方向为中药药理与新药研发。Tel: (0351)7019297 E-mail: jstian@sxu.edu.cn

***通信作者** 秦雪梅 Tel: (0351)7018379 Fax: (0351)7018379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

系统生物学方法,其通过揭示新陈代谢动态进程中代谢产物的变化规律,较全面了解病理变化过程及机体内物质的代谢途径,广泛应用于基础生物学、分子病理学、临床诊断、生物医药、环境科学等各种不同的领域^[2-6]。

本课题组前期成功复制了慢性温和不可预知应激抑郁(CUMS)大鼠模型,并对大鼠尿液、血液、海马组织等生物样本进行了系统研究^[7-8],建立了这些样本的代谢组学研究方法,发现了与抑郁症有关的潜在生物标志物。粪便为临床诊断疾病或评价药物疗效的重要依据之一,然而关于粪便代谢组学的研究鲜见报道,其内源性代谢产物与其他生物样本中的是否有差异也尚不清楚。因此,本实验采用代谢组学方法考察 CUMS 模型大鼠粪便样本代谢物的变化,旨在发现其中与抑郁症相关的潜在生物标志物,为抑郁症发病机制及抗抑郁药物作用机制的探讨提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SD 成年雄性大鼠,SPF 级,体质量 180~200 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2011-0012。动物在自然昼夜节律光照下适应 1 周后进行实验。

1.2 仪器与试剂

Bruker 600-MHz AVANCE III 核磁共振检测仪,德国布鲁克公司;CENTRIFUGE TDL-5 型离心机,上海安亭科学仪器厂;电子超声组织匀浆器,宁波新芝生物科技股份有限公司。 D_2O ,美国默克试剂公司。

2 方法

2.1 CUMS 模型复制

大鼠随机分为对照组和模型组,每组 10 只。模型组大鼠参考 Willner 等^[9]方法并根据本实验室方法加以改进^[10-11]。刺激因子包括禁食 24 h、禁水 24 h、4 °C 冰水游泳 5 min、50 °C 热应激 10 min、夹尾 2 min、电击足底 5 min、噪音刺激 3 h 共 7 种,每天 1 种,每种刺激随机实施 3~4 次,持续 28 d。对照组不给予任何刺激,保持正常喂饲和饮水。分别在刺激前及刺激 28 d 后测定对照组和模型组大鼠的体质量、糖水偏爱率以及旷场实验中的穿越格数和直立次数等。

2.2 粪便样本收集

大鼠刺激 28 d 后,在代谢笼中收集 12 h 内的粪便。将粪便样本保存于-80 °C 冰箱中,待测。

2.3 1H -NMR 代谢组学研究

2.3.1 样本处理^[12] 将粪便样本在液氮中研磨,称取其粉末 200 mg 置于 Eppendorf 离心管中,加入 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液 2 mL (D_2O 配制),电子超声匀浆器匀浆 2 min,4 °C、13 000 r/min 离心 15 min,取上清液 600 μ L 转移到核磁管中,待测。

2.3.2 1H -NMR 测定条件 在 Bruker 600 MHz AVANCE III NMR 谱仪上采集数据,采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 脉冲序列,参数设置为自旋弛豫延迟为 320 ms、自由感应衰减为 64 K 数据点、谱宽为 8 kHz、扫描 64 次。

2.3.3 1H -NMR 图谱处理 采用 MestReNova 核磁图谱专业处理软件对所有 1H -NMR 图谱进行傅里叶转换并进行相位、基线调整。在 NMR-CPMG 图谱中,以醋酸(δ 1.92)为标准对谱图进行化学位移的校正;以 δ 0.01 为单位,对 δ 0.50~9.00 区域的谱图进行等宽度分割,水峰 δ 4.70~5.02 区域切除;对图谱进行分段积分,将所产生的积分数据归一化。

2.4 统计学分析

采用 SIMCA-P 13.0 软件将 1H -NMR 采集处理的积分数据进行中心化和规格化后,进行主成分分析(PCA)、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)。使用 SPSS 17.0 软件,采用独立样本 t 检验对具有差异的生物标志物进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 大鼠行为学指标观察

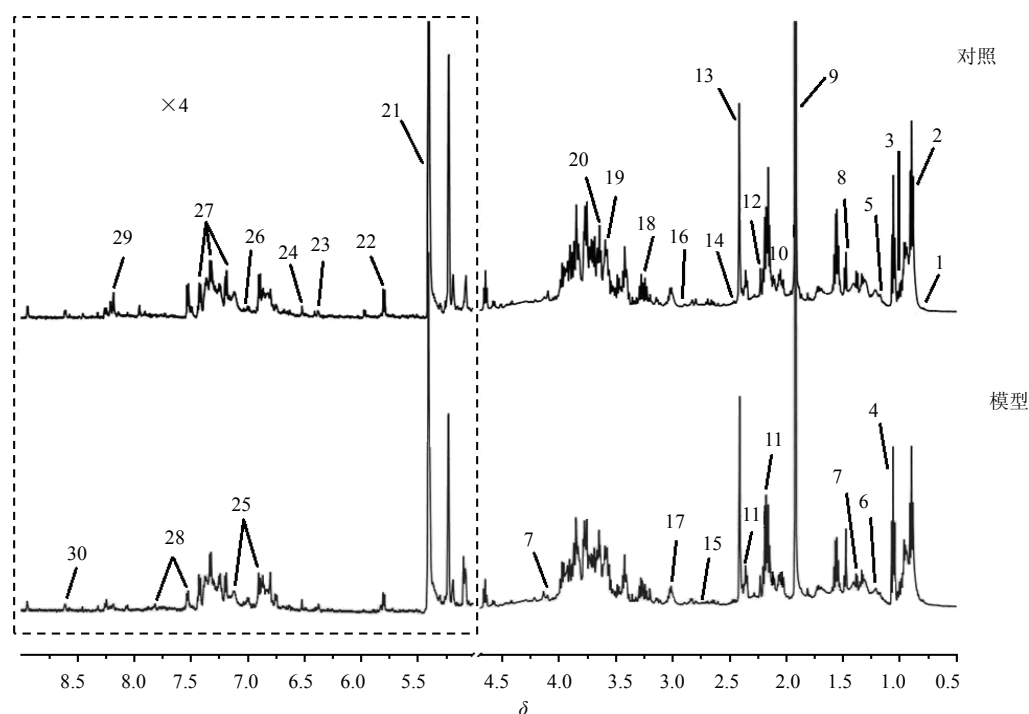
与对照组比较,模型组大鼠体质量、糖水偏爱率、穿越格数及直立次数等行为学指标显著变化($P < 0.05$),表明 CUMS 大鼠模型复制成功^[13]。

3.2 1H -NMR 图谱的指认与分析

结合每个代谢物的化学位移,裂峰情况及偶合常数^[7,14-15],并且参照 Chenomx NMR Suite 数据库(加拿大 Chenomx Inc. 公司),对本实验所得的图谱进行指认,从该图谱中指认了 30 种化合物(图 1),包括氨基酸、有机酸等。化学位移指认结果见表 1。

3.3 1H -NMR 代谢组学数据分析

采用 PCA 法对所有大鼠粪便样本的 1H -NMR 代谢轮廓进行分析(图 2)。由图 2 可见,对照组与模型组的散点有分开的趋势,因此进一步采用 PLS-DA 方法进行分析,3D-PLS-DA 分析散点图见图 3。可见对照组与模型组的散点能够区分,表明 CUMS 动物模型复制成功。

图1 大鼠粪便样本¹H-NMR图谱Fig. 1 ¹H-NMR spectra for faeces of rats表1 大鼠粪便样本¹H-NMR图谱中主要代谢产物峰归属及其VIP值和P值Table 1 Peak attribution in ¹H-NMR spectra and VIP or P value of main metabolites in faeces of rats

编号	代谢物	基团	δ	VIP ^Δ	P [*]
1	胆汁酸	CH ₃ , (CH ₂) _n , CH ₂ -C=C, CH ₂ -C=O, C-CH ₂ -C=, CH=CH	0.73 (m)		
2	丁酸	CH ₃ , CH ₂ , CH ₂	0.94 (t, <i>J</i> = 8.87 Hz), 1.58 (m), 2.16 (t, <i>J</i> = 8.80 Hz)	1.19	0.55
3	异亮氨酸	αCH, βCH, γCH ₃ , δCH ₃	1.02 (d, <i>J</i> = 7.00 Hz), 0.99 (t, <i>J</i> = 7.41 Hz), 1.95 (m), 3.65 (d, <i>J</i> = 3.97 Hz)		
4	缬氨酸	αCH, βCH, γCH ₃	1.04 (d, <i>J</i> = 8.46 Hz), 0.98 (d, <i>J</i> = 8.41 Hz), 2.26 (m), 3.6 (d, <i>J</i> = 5.20 Hz)		
5	β-甲基-α-酮戊酸	βCH ₃ , γCH ₃ , γCH ₂ , γCH	1.13 (d, <i>J</i> = 8.44 Hz), 0.93 (t, <i>J</i> = 8.96 Hz), 1.73 (m), 2.93 (m)		
6	α-酮戊二酸	CH ₂ , CH ₂	2.45 (t, <i>J</i> = 6.95 Hz), 3.01 (t, <i>J</i> = 6.84 Hz)		
7	乳酸	αCH, βCH ₃	1.34 (d, <i>J</i> = 8.40 Hz), 4.11 (q, <i>J</i> = 8.32 Hz)	4.98	0.04
8	丙氨酸	αCH, βCH ₃	1.44 (d, <i>J</i> = 8.57 Hz), 3.77 (q, <i>J</i> = 7.23 Hz)		
9	醋酸盐	CH ₃	1.92 (s)		
10	脯氨酸	3-CH ₂ , 2-CH, 4-CH ₂ , 5-CH ₂	2.05 (m), 4.12 (dd, <i>J</i> = 8.63, 6.42 Hz), 1.92 (m), 1.52 (m), 3.33 (dt, <i>J</i> = 14.02, 7.10 Hz)	0.44	
11	谷氨酰胺	αCH, βCH ₂ , γCH ₂	2.15 (m), 2.44 (m)	2.57	0.01
12	丙酸	αCH ₂ , βCH ₃	2.23 (q, <i>J</i> = 9.19 Hz), 1.10 (t, <i>J</i> = 9.22 Hz)		
13	琥珀酸	CH ₃	2.40 (s)		
14	谷氨酸	αCH, βCH ₂ , γCH ₂	2.45 (m), 2.08 (m), 3.75 (dd, <i>J</i> = 8.62, 5.66 Hz)	1.14	0.15
15	天冬氨酸	βCH ₂ , αCH	2.67 (dd, <i>J</i> = 17.45, 8.85 Hz), 3.89 (dd, <i>J</i> = 8.82, 3.75 Hz)	1.37	0.04

续表 1

编号	代谢物	基团	δ	VIP [△]	P [*]
16	天冬酰胺	βCH_2 , αCH , γNH_2	2.85 (m), 4.00 (dd, $J = 9.23$, 5.11 Hz), 6.91 (s)	1.14	0.07
17	赖氨酸	αCH , βCH_2 , γCH_2 , δCH_2	3.04 (t, $J = 7.57$ Hz), 3.76 (t, $J = 6.11$ Hz), 1.89 (m), 1.72 (m)		
18	精氨酸	5- CH_2 , 2-CH, 3- CH_2 , 4- CH_2	3.25 (t, $J = 8.32$ Hz), 3.76 (t, $J = 7.33$ Hz), 1.90 (m), 1.64 (m)		
19	甘氨酸	CH_2	3.57 (s)		
20	苏氨酸	αNH_2 , βCH_3 , βOH	3.58 (d, $J = 5.84$ Hz), 1.32 (d, $J = 7.90$ Hz), 4.26 (m)		
21	尿囊酸	CH	5.40 (s)		
22	尿嘧啶	5-CH, 6-CH	5.80 (d, $J = 9.23$ Hz), 7.53 (d, $J = 9.22$ Hz)	2.07	0.04
23	尿刊酸	αCH , βCH	6.40 (d, $J = 19.12$ Hz), 7.30 (d, $J = 19.34$ Hz),		
24	延胡索酸	CH	6.52 (s)		
25	酪氨酸	CH, βCH_2 , αCH	6.89 (dd, $J = 2.6$ Hz), 7.18 (dd, $J = 3.5$ Hz), 3.04 (dd, $J = 8.0$, 9.0 Hz), 3.93 (m)	1.16	0.01
26	组氨酸	2-CH, 4-CH, βCH_2 , αCH	7.08 (d, $J = 0.58$ Hz), 7.75 (d, $J = 1.13$ Hz), 3.14 (dd, $J = 15.55$, 7.74 Hz), 3.98 (dd, $J = 7.73$, 4.98 Hz)		
27	苯丙氨酸	Ring-CH, βCH_2 , αCH	7.40 (m), 7.33 (d, $J = 8.35$ Hz), 3.11 (m), 3.98 (dd, $J = 9.46$, 6.37 Hz)	1.21	0.02
28	色氨酸	3-CH, 6-CH, 1-CH, 4-CH, 5-CH, αCH , βCH_2	7.53 (d, $J = 8.16$ Hz), 7.80 (d, $J = 9.99$ Hz), 7.31 (s), 7.27 (m), 7.19 (m), 4.05 (dd, $J = 8.10$, 4.85 Hz), 3.48 (dd, $J = 15.38$, 4.72 Hz)		
29	腺嘌呤	1-CH, 4-CH	8.17 (s), 8.21 (s)		
30	甲酸盐	CH	8.45 (s)		

*-与对照组比较; [△]-重要性系数

*-vs control group; [△]- variable important coefficient

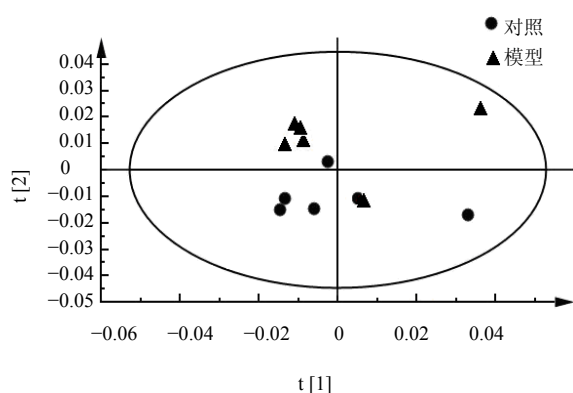


图 2 大鼠粪便样本 ¹H-NMR 谱 PCA 分析散点图
Fig. 2 PCA score plots in ¹H-NMR spectra in faeces of rats

为了探寻由 CUMS 引起的发生显著变化的生物标志物, 进一步对数据进行 OPLS-DA 分析, 其散点图和载荷图分别见图 4、5。由图 4 可知, 模型组与对照组大鼠粪便样本中标示内源性生物标志物的散点能够明显分开, 这与行为学结果相一致^[13]。

依据离原点较远点的 VIP 值较大, 变量的 VIP

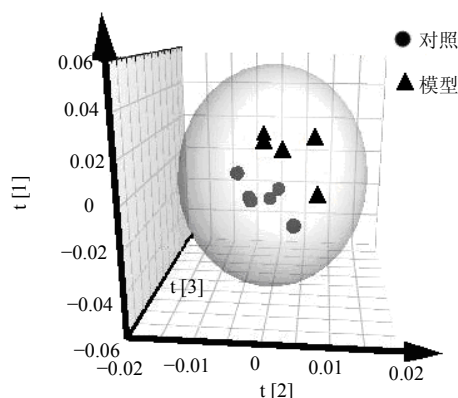
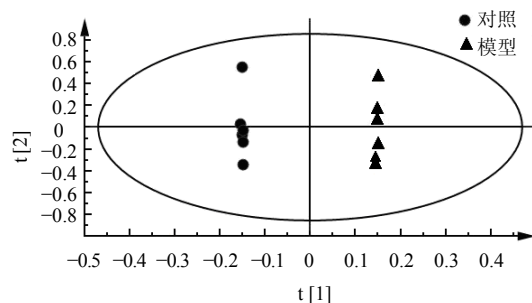
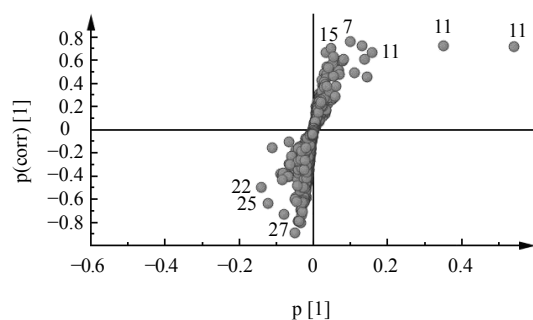
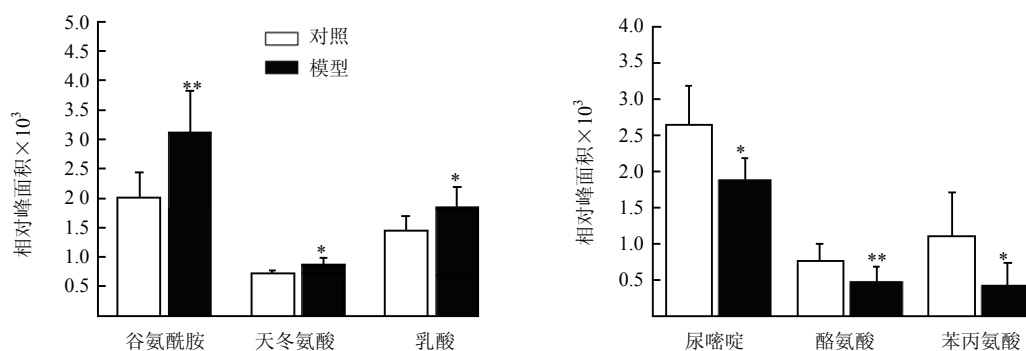


图 3 大鼠粪便样本 ¹H-NMR 谱 3D-PLS-DA 分析散点图
Fig. 3 3D-PLS-DA score plots in ¹H-NMR spectra in faeces of rats

值越大, 对分组的贡献就越大的原则, 得到 10 个 VIP>1 的代谢物。用 SPSS 软件对这些代谢物的峰面积进行独立样本 t 检验, 得到与对照组比较具有显著差异 ($P<0.05$) 的潜在生物标志物 (图 6)。由图 6 可知, 模型组大鼠粪便代谢产物中谷氨酰胺、

图4 大鼠粪便样本¹H-NMR谱OPLS-DA分析散点图Fig. 4 OPLS-DA score plots in ¹H-NMR spectra in faeces of rats

7-乳酸 11-谷氨酰胺 15-天冬氨酸 22-尿嘧啶 25-酪氨酸
27-苯丙氨酸
7-lactate 11-glutamine 15-aspartate 22-uracil 25-tyrosine
27-phenylalanine

图5 大鼠粪便样本¹H-NMR谱OPLS-DA分析载荷图Fig. 5 OPLS-DA S-plots in ¹H-NMR spectra in faeces of rats与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group图6 大鼠粪便样本¹H-NMR谱OPLS-DA分析载荷图中变化显著的生物标志物Fig. 6 Significant potential bio-markers of OPLS-DA S-plots in ¹H-NMR spectra in faeces of rats

以完成包括 NMR 图谱前处理、代谢产物指认等过程。Chenomx Library 是将对照品置于不同序列和不同条件(如频率、pH 值、离子强度等)下进行 NMR 分析获得的数据库信息,包括各种氨基酸、脂肪酸、

乳酸和天冬氨酸的量增加,而尿嘧啶、酪氨酸和苯丙氨酸的量减少,且与对照组比较具有显著差异。

4 讨论

抑郁症具有起病缓慢、病程较长、反复发作的特点,其症状表现多样,可涉及全身各个系统。由于其发病机制复杂,诱因较多,患者存在神经、内分泌、免疫等多个系统病理性改变,目前尚无明确的可以预测抗抑郁药物有效性的生物学指标^[16]。现代医学诊治抑郁症使用的是经过标准化的症状辨析系统,即诊断标准和评价量表等,这种基于症状的诊断和评价体系在普及抑郁症的防治和临床诊断工作中发挥了重要作用,但这种仅依靠量表的诊断方式存在客观性差、准确性差、诊断识别率低等问题,因此建立客观、定量、准确的生物学检测方法用于抑郁症的诊断和治疗显得尤为重要。

基于¹H-NMR 测试与多元统计分析方法相结合的代谢组学技术能够对生物体中随时间改变的代谢产物进行动态跟踪检测和定性和定量分析,然后将得到的生物信息与病理生理过程中生物学事件关联起来,进而确定发生这些变化的靶器官和作用位点,从而发现相关的生物标志物,揭示其生物学意义,从分子水平上认识疾病发生的机制、探讨药物治疗疾病的规律^[17-18]。Chenomx NMR Suite 是一组用于识别和量化代谢产物的 NMR 图谱的集成工具,可

酮酸、糖类、氮氧化物、磷酸盐等在动植物内常见的生化类小分子物质共计 500 余种,且仍在不断补充之中,是 NMR 代谢产物分析中重要的指认工具之一^[19]。

动物粪便中的大部分代谢产物与肠道菌群有密切关系,而肠道菌群功能的失调与精神系统疾病的发生、发展密不可分^[20]。研究表明,精神类疾患会引起肠道生理状态发生变化,而肠道环境的改变则会在一定程度上影响肠道微生物的结构组成,导致菌群失调,从而加重疾病的发展^[21]。应激能够导致动物粪便微生物区系改变和神经内分泌异常、脑-肠轴异常及肠道菌群代谢产物改变^[22-24]。越来越多的证据表明脑和肠是双向交流的,其中包括神经、免疫和内分泌途径。这些双向途径为抑郁症和肠内微生物架起了一个连接,肠内微生物群的变化为抑郁症的诊断和治疗提供了一个新的目标^[25]。因此,采用¹H-NMR代谢组学的方法研究粪便中代谢产物的变化规律,是探讨疾病发生机制、增强临床诊断的客观性以及药物临床疗效的有效途径之一。

本实验复制与抑郁症患者临床症状最为接近的大鼠 CUMS 抑郁模型,采用¹H-NMR 技术对造模 28 d 后的大鼠粪便进行分析,发现与抑郁症有关的可能生物标志物。结果表明,在大鼠粪便中发现的部分代谢产物如谷氨酰胺、天冬氨酸、苯丙氨酸、尿嘧啶等的变化可能引起机体部分代谢途径的改变,从而引起疾病的发生,其中尿嘧啶是文献报道较少的代谢产物之一。有研究显示尿嘧啶能够明显抑制单胺氧化酶(MAO)的活性^[26],而 MAO 抑制剂是重要的抗抑郁药物,因此体内尿嘧啶量的减少可能与抑郁症的发生有关,也可能成为使用粪便作为诊断抑郁症的重要生化指标。上述标志物的发现有助于解释抑郁症的病理机制,同时也为抑郁症的临床诊断及抗抑郁新药研发提供新方法和新思路。

参考文献

- [1] Liu X, Zhou Y, Li Z, *et al.* Anti-depressant effects of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress: a plasma metabonomics study based on NMR spectroscopy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(4): 578-588.
- [2] Nicholson J K, Lindon J C. Systems biology: Metabonomics [J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1054-1056.
- [3] 王雪洁, 李震宇, 薛水玉, 等. 基于植物代谢组学技术的远志不同炮制品质量控制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(9): 1727-1737.
- [4] 薛水玉, 郑兴宇, 窦春燕, 等. 文拉法辛和氟西汀抗抑郁作用机制和药效特点的代谢组学研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(1): 29-33.
- [5] 芦林林, 周玉枝, 马致洁, 等. 应用基于¹H NMR 的代谢组学评价逍遥散的抗抑郁有效组分 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(2): 225-230.
- [6] 郑兴宇, 高晓霞, 刘晓节, 等. 基于代谢组学技术应激抑郁动物模型的评价 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(3): 175-179.
- [7] Tian J S, Shi B Y, Xiang H, *et al.* ¹H-NMR-based metabonomic studies on the anti-depressant effect of genipin in the chronic unpredictable mild stress rat model [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e75721.
- [8] 郭秉荣, 杨 岚, 高晓霞, 等. 慢性不可预知温和应激配合孤养抑郁模型大鼠海马的代谢组学研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(14): 1160-1164.
- [9] Willner P, Benton D, Brown E, *et al.* Depression increases craving for sweet rewards in animal and human models of depression and craving [J]. *Psychopharmacology*, 1998, 136(3): 272-283.
- [10] Gao X, Zheng X, Li Z, *et al.* Metabonomic study on chronic unpredictable mild stress and intervention effects of Xiaoyaosan in rats using gas chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 690-699.
- [11] Zhou Y, Lu L, Gao X, *et al.* Antidepressant-like effects of the fractions of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 236-244.
- [12] Martin F P, Sprenger N, Montoliu I, *et al.* Dietary modulation of gut functional ecology studied by fecal metabonomics [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(10): 5284-5295.
- [13] 郭晓擎, 田俊生, 秦雪梅, 等. 南柴胡和北柴胡组成的逍遥散抗抑郁作用的¹H-NMR代谢组学研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(11): 2209-2216.
- [14] Hong Y S, Ahn Y T, Park J C, *et al.* ¹H NMR-based metabonomic assessment of probiotic effects in a colitis mouse model [J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33(7): 1091-1101.
- [15] Romick-Rosendale L E, Goodpaster A M, Hanwright P J, *et al.* NMR-based metabonomics analysis of mouse urine and fecal extracts following oral treatment with the broad-spectrum antibiotic enrofloxacin Baytril [J]. *Magn Reson Chem*, 2009, 47(1): S36-S46.
- [16] 龚绍麟. 抑郁症 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [17] Aranibar N, Ott K H, Roongta V, *et al.* Metabolomic analysis using optimized NMR and statistical methods [J]. *Anal Biochem*, 2006, 355(1): 62-70.
- [18] Lindon J C, Nicholson J K, Holmes E. *Handbook of Metabonomics and Metabolomics* [M]. Beijing: Science Press, 2008.
- [19] Moroz J, Turner J, Slupsky C, *et al.* Tumour xenograft detection through quantitative analysis of the metabolic

- profile of urine in mice [J]. *Phys Med Biol*, 2011, 56(3): 535-556.
- [20] Dinan T G, Quigley E M M, Ahmed S M M, *et al.* Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(2): 304-311.
- [21] Koloski N A, Talley N J, Boyce P M. Predictors of health care seeking for irritable bowel syndrome and nonulcer dyspepsia: a critical review of the literature on symptom and psychosocial factors [J]. *Am J Gastroenterol*, 2001, 96: 1340-1349.
- [22] O'Mahony S M, Marchesi J R, Scully P, *et al.* Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses [J]. *Biol Psychiat*, 2009, 65(3): 263-267.
- [23] Maes M, Kubera M, Leunis J C. The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2008, 29(1): 117-124.
- [24] Dunlop S P, Jenkins D, Neal K R, *et al.* Relative importance of enterochromaffin cell hyperplasia, anxiety, and depression in postinfectious IBS [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(6): 1651-1659.
- [25] 李金兵, 李翼鹏, 田俊生, 等. 基于慢性温和不可预知应激模型内源性代谢物变化探讨抑郁症病理机制 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 108-115.
- [26] 陈晓光, 王本祥, 张洁, 等. 尿嘧啶对单胺氧化酶的抑制作用 [J]. 生物化学杂志, 1992, 8(1): 81-85.