

远志提取物对抑郁大鼠肠道菌群的作用研究

陈启军, 于 岚, 赵文文, 许荣蓉, 陈筱清, 吴 霞*, 巴寅颖*

首都医科大学中医药学院, 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069

摘要: **目的** 探讨远志提取物对抑郁大鼠肠道菌群的影响及其可能的作用机制。**方法** 采用孤养结合慢性不可预知性温和应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 方法建立抑郁大鼠模型, SD 大鼠随机分为对照组、空白给药组、模型组、氟西汀 (2 mg/kg) 组和远志提取物高、中、低剂量 (1.5、1.0、0.5 g/kg) 组。观察各组大鼠行为学并检测海马组织单胺类神经递质及其代谢物水平; 采用 ELISA 法检测大鼠血清中促肾上腺皮质激素释放因子 (corticotropin-releasing factor, CRF)、促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、皮质酮 (corticosterone, CORT)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 水平; 采用透射电镜 (TEM) 观察大鼠十二指肠和结肠上皮的超微结构变化; 采用 16S rRNA 测序检测大鼠粪便肠道菌群的结构变化。**结果** 与模型组比较, 远志提取物可明显改善大鼠的抑郁样行为 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 显著升高海马组织中去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、二羟基苯乙酸 (dihydroxyphenyl acetic acid, DOPAC) 和 5-羟吲哚乙酸 (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA) 水平 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 显著降低血清中 CRF、ACTH、CORT、IL-6 和 LPS 水平 ($P < 0.01, 0.001$), 减轻其下丘脑-垂体-肾上腺皮质 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 轴的功能亢进状态; 同时远志提取物对大鼠肠道内的菌群失调具有调节作用。**结论** 远志提取物可以通过改善肠道菌群结构、恢复肠屏障功能、降低肠源性内毒素释放、减轻机体炎症水平, 从而发挥抗抑郁作用。

关键词: 远志提取物; 抑郁症; 慢性不可预知性温和应激; 肠道菌群; 16S rRNA

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)08-2313-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.014

Effect of *Polygalae Radix* extract on gut microbiota of depression rat

CHEN Qi-jun, YU Lan, ZHAO Wen-wen, XU Rong-rong, CHEN Xiao-qing, WU Xia, BA Yin-ying

Beijing Key Lab of TCM Collateral Disease Theory Research, School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of Yuanzhi (*Polygalae Radix*) extract on gut microbiota of depressed rats. **Methods** Orphans and chronic unpredictable mild stress (CUMS) were used to establish depression rats model. SD rats were randomly divided into control group, control administration group, model group, fluoxetine (2 mg/kg) group and extract of *Polygalae Radix* high-, medium- and low-dose (1.5, 1.0, 0.5 g/kg) groups. Behavior of rats in each group were observed and levels of monoamine neurotransmitters and their metabolites in hippocampus were detected; ELISA were used to detect levels of corticotropin-releasing factor (CRF), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticosterone (CORT), interleukin-6 (IL-6) and lipopolysaccharide (LPS) in serum of rats; Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe ultrastructural changes of duodenum and colon epithelium of rats; 16S rRNA sequencing was used to detect structural changes of gut microbiota in feces of rats. **Results** Compared with model group, depression-like behaviors of rats in *Polygalae Radix* extract groups were significantly improved ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); Levels of norepinephrine (NE) and 5-hydroxytryptamine (5-HT), dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in hippocampus were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); Levels of CRF, ACTH, CORT, IL-6 and LPS in serum were significantly reduced ($P < 0.01, 0.001$), hyperfunction of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis was alleviated; *Polygalae Radix* extract had a regulatory effect on imbalance of gut microbiota flora in rats. **Conclusion** *Polygalae Radix* extract plays an antidepressant effect by improving structure of gut

收稿日期: 2020-10-23

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81703670)

作者简介: 陈启军 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础研究。E-mail: qijun@ccmu.edu.cn

*通信作者: 吴 霞, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础与新药研发。E-mail: wuxia6710@163.com

巴寅颖, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础与新药研发。E-mail: bayinying@ccmu.edu.cn

microbiota, restoring intestinal barrier function, reducing release of intestinal endotoxin and inhibiting inflammation.

Key words: *Polygalae Radix* extract; depression; chronic unpredictable mild stress; gut microbiota; 16S rRNA

抑郁症是常见的情感障碍性精神疾病,其临床表现为情绪低落、食欲不振、思维迟钝、言语兴趣减退、失眠等,患者严重时常有自杀倾向^[1]。据世界卫生组织最新统计显示,预测到 2030 年,抑郁症将成为全球疾病负担的主要原因^[2]。抑郁症发病机制复杂,通常认为其与脑内 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)等神经递质减少以及下丘脑-垂体-肾上腺皮质(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴功能亢进和免疫炎症系统异常等因素有关^[3]。研究表明,抑郁症患者与健康人群的肠道菌群结构存在差异,抑郁症患者肠道内拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)相对丰度明显升高,厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度显著降低^[4]。研究发现,通过调节肠道菌群能够改善抑郁症患者或抑郁模型动物的抑郁症状。肠道菌群的改变可通过 HPA 轴、免疫炎症反应、神经递质信号传导影响中枢神经系统,进而参与抑郁症的发生发展^[4]。抑郁症患者常伴有肠屏障功能障碍、压力应激和 HPA 轴功能亢进,肠黏膜的通透性增加^[5]。肠屏障受损不仅会破坏肠道菌群平衡,肠道菌群的失衡及肠黏膜通透性增加也会导致肠道内毒素增加并大量进入到血及组织中,进而促进细胞因子、炎性介质释放,进一步加重肠道屏障损伤,同时启动系统性炎症反应,而炎症反应导致的神经功能的改变在抑郁症发病过程中起到重要作用^[6]。

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 或卵叶远志 *P. sibirica* L. 的干燥根,具有安神益智、交通心肾的功效,临床上常用于治疗失眠、多梦、心悸、神志恍惚等症状^[7]。现代药理学研究表明,远志能够通过影响单胺类神经递质功能、拮抗 HPA 轴功能亢进、上调脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase B, TrkB) 表达等,从而发挥抗抑郁作用^[8]。远志皂苷和远志寡糖酯类为远志提取物中的抗抑郁活性成分,但这 2 类成分吸收差、生物利用度低^[9-12],提示其可能通过调节肠道微生态发挥抗抑郁作用。本研究采用孤养结合慢性不可预知温和刺激(chronic unpredicted mild

stress, CUMS) 建立抑郁大鼠模型,评价远志提取物对抑郁大鼠行为学指标、海马组织神经递质水平、HPA 轴功能、肠屏障功能及肠道菌群结构的影响,探讨肠道菌群在远志治疗抑郁症中的作用,并以京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库为基础进行菌群功能预测分析,寻找显著改变的代谢途径,分析远志抗抑郁作用的可能通路,为进一步阐明其作用机制提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 56 只,6 周龄,体质量 220~250 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 SYXK(京)2010-0020。动物于温度(24±1)℃、相对湿度(60±5)%、自然昼夜节律光照环境,适应性饲养 1 周。动物实验经首都医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号 AEEI-2015-054)。

1.2 药材

远志饮片(批号 18070101,产地为山西)购自北京人卫中药饮片厂,由首都医科大学中医药学院罗容副教授鉴定为远志科植物远志 *P. tenuifolia* Willd. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

3,6'-二芥子酰基蔗糖(质量分数≥98%,批号 PRF8041747)、细叶远志苷 A(质量分数≥98%,批号 PRF9011241)、远志皂苷 B(质量分数≥98%,批号 PRF8112741)购自成都普瑞法科技开发有限公司;盐酸氟西汀胶囊(批号 J2017002,20 mg/粒)购自礼来苏州制药有限公司;大鼠促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin-releasing factor, CRF) ELISA 试剂盒(批号 BG20190713RAC)、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH) ELISA 试剂盒(批号 BG20190713RAC)、皮质酮(corticosterone, CORT) ELISA 试剂盒(批号 BG20190713RAC)、大鼠脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) ELISA 试剂盒(批号 BG200831RAC)购自上海蓝基生物科技有限公司;大鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒(批号 R200827-003a)购自欣博盛生物科技有限公司;粪

便 DNA 提取试剂盒(批号 51504)购自德国 QIAGEN 公司; 5-HT (批号 H9523)、NE (批号 A7257)、多巴胺 (dopamine, DA, 批号 H8502) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 5-羟吲哚乙酸 (5-hydroxy-indoleacetic acid, 5-HIAA, 批号 H8876)、高香草酸 (high vanillic acid, HVA, 批号 H1252) 和二羟基苯乙酸 (dihydroxyphenyl acetic acid, DOPAC, 批号 850217) 对照品购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 质量分数 $\geq 98\%$ 。

1.4 仪器

HHS 型电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 旋转蒸发仪(日本 EYELA 公司); 低温冷冻离心机(美国 Sigma 公司); DYY-7C 电泳仪(北京六一仪器厂); NanoDrop 1000 紫外分光光度计、U3000 超高液相色谱仪(美国 Thermo 公司); GelDocXR 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); ELX800 酶标仪(美国 Bio Tek 公司); 旷场实验系统(上海欣软信息科技有限公司); Waters 2965 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司); HT7700 透射电子显微镜(TEM, 日本日立公司)。

2 方法

2.1 混合对照品的制备

分别取 3,6'-二芥子酰基蔗糖、细叶远志苷 A、远志皂苷 B 对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 配制成质量浓度为 0.332、0.410、0.406 mg/mL 的 3,6'-二芥子酰基蔗糖、细叶远志苷 A、远志皂苷 B 储备液。精密量取以上对照品储备液, 配制成 3,6'-二芥子酰基蔗糖、细叶远志苷 A、远志皂苷 B 质量浓度分别为 0.111、0.068、0.203 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2 远志提取物的制备

称取远志饮片 1.2 kg, 加入 8 倍量 60%乙醇回流提取 1.5 h, 共提取 3 次, 合并提取液, 滤过, 回收乙醇得到远志提取物 528 g, 出膏率为 44%。采用超高效液相色谱法 (ultra-performance liquid chromatography, UPLC) 对远志提取物中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、细叶远志苷 A 和远志皂苷 B 的含量进行测定。色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相为乙腈 (A) -0.1%甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~3 min, 15%~20% A; 3~8 min, 20%~27% A; 8~12 min, 27%~36% A; 12~30 min, 36% A; 体积流量为 0.4 mL/min; 柱温为 40 $^{\circ}$ C; 检测波长为 330 nm。

2.3 CUMS 模型建立、分组与给药

SD 大鼠随机分为对照组、空白给药组、模型组、盐酸氟西汀 (2 mg/kg) 组和远志提取物高、中、低剂量 (1.5、1.0、0.5 g/kg, 分别相当于临床 1.5 倍剂量、临床等效剂量、临床 0.5 倍剂量), 每组 8 只。除对照组和空白给药组, 其余各组采用孤养结合 CUMS 方法建立抑郁大鼠模型^[13]。应激方式包括禁水 24 h、禁食 24 h、潮湿垫料 24 h、4 $^{\circ}$ C 冰水游泳 5 min、夹尾 1 min、束缚 2 h、频闪 24 h、噪音 24 h、光照 24 h, 每天随机安排 1~2 种刺激, 持续 8 周。远志提取物以蒸馏水配制成质量浓度为 132、88、44 mg/mL 的溶液, 分别用作远志提取物高、中、低剂量组。造模同时, 各给药组大鼠 ig 相应药物 (5 mL/kg), 空白给药组大鼠 ig 等体积高剂量远志提取物, 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 8 周, 每 2 周记录大鼠体质量。

2.4 远志提取物对抑郁大鼠行为学的影响

参照文献方法^[14], 第 8 周测定大鼠的糖水偏好率、旷场行为 (总移动距离、中央区逗留时间和直立次数) 和强迫游泳不动时间。

2.5 远志提取物对抑郁大鼠血清中 CORT、CRF、ACTH、IL-6 和 LPS 水平的影响

行为学测试结束后, 大鼠 ip 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉取血, 静置 1~2 h, 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 15 min, 收集血清, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存。按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清中 CRF、ACTH、CORT、IL-6 和 LPS 水平。

2.6 远志提取物对抑郁大鼠海马组织中单胺类神经递质及其代谢物水平的影响

行为学测试结束后, 大鼠断头取海马组织, 称定质量, 加入 120 μ L 冰冷样品预处理 A 液 (0.4 mol/L 高氯酸), 冰浴中快速匀浆, 静置 30 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液 90 μ L, 加入 45 μ L 样品预处理 B 液 (20 mmol/L 柠檬酸钾、0.3 mol/L 磷酸氢二钾、2 mmol/L EDTA·2Na), 涡旋混匀, 冰浴静置 30 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液, 经 0.22 μ m 滤膜滤过。根据文献方法^[15], 使用 Waters 2965 高效液相色谱系统检测海马组织中 DA、5-HT、NE、DOPAC、5-HIAA、HVA 水平。色谱柱为 Waters symmetry shield RP 18 (150 mm $\times$ 3.9 mm, 5 μ m); 流动相为缓冲盐溶液 (50 mmol/L 单水柠檬酸、70 mmol/L 无水乙酸钠、10 mmol/L EDTA·2Na、180 mmol/L 辛烷磺酸钠) -甲

醇 (92:8); 体积流量为 0.8 mL/min; 检测电压为 0.6 V; 柱温为 30 °C; 进样量为 40 μ L。

2.7 远志提取物对抑郁大鼠十二指肠和结肠上皮超微结构的影响

取大鼠十二指肠和结肠上皮组织, 于 2.5%戊二醛缓冲液中固定 2 h, 用 0.1 mol/L PB 缓冲液洗涤 15 min, 洗涤 3 次; 于 1%锇酸中固定 1 h, 乙醇梯度脱水、环氧树脂包埋后切片 (厚 50~70 nm)。于 TEM 下观察十二指肠和结肠上皮的超微结构变化。

2.8 肠道菌群 16S rRNA 基因测序分析

行为学测试结束后, 收集大鼠新鲜粪便, 于 -80 °C 保存。采用粪便 DNA 提取试剂盒提取粪便样品总 DNA, NanoDrop1000 测定 DNA 质量浓度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量。采用引物 338F 和 806R 通过 PCR 扩增样品的 V3~V4 区域, 进行纯化与定量后, 构建测序文库。使用 QIIME 软件, 对有效序列按 97%序列相似度进行归并和可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 划分, 以每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列。将 OTU 的代表序列与 Greengenes 数据库 (Release 13.8) 中的模板序列进行比对, 得到所有 OTU 在微生物门、纲、目、科、属、种分类水平下的菌群数信息。通过分类学组成分析、 α 多样性分析、 β 多样性分析和 KEGG 代谢途径预测分析等方法对粪便肠道菌群进行分析。

2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较使用单因素方差分析; 大鼠体质量变化采用双因素方差分析; 肠道菌群丰度多组间比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验分析。

3 结果

3.1 远志提取物中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、细叶远志苷 A 和远志皂苷 B 的含量

经方法学考察, 远志提取物中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、细叶远志苷 A 和远志皂苷 B 分别在 0.008 3~0.332 0、0.010 2~0.410 0、0.010 1~0.406 0 mg/mL 呈现良好的线性关系; 3 种成分的平均加样回收率分别为 101.22%、100.46%、99.70%, RSD 分别为 1.67%、2.81%、2.93%; 精密度 RSD 分别为 0.90%、1.27%、1.06%; 重复性 RSD 分别为 2.57%、2.66%、2.34%; 24 h 稳定性 RSD 分别为 1.56%、1.92%、2.03%。UPLC 色谱图见图 1, 运用该方法测得远志提取物中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、细叶远志苷 A 和远

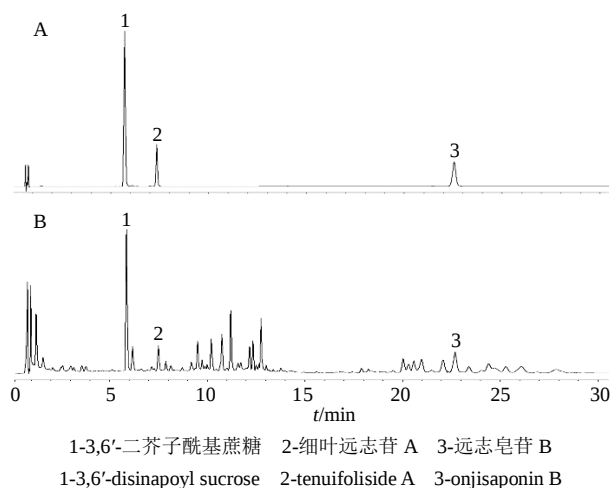


图 1 混合对照品 (A) 及远志提取物 (B) 的 UPLC 色谱图
Fig. 1 UPLC chromatogram of mixed standards (A) and *Polygalae Radix* extract (B)

志皂苷 B 的质量分数分别为 9.77、3.89、15.94 mg/g。

3.2 远志提取物对抑郁大鼠体质量的影响

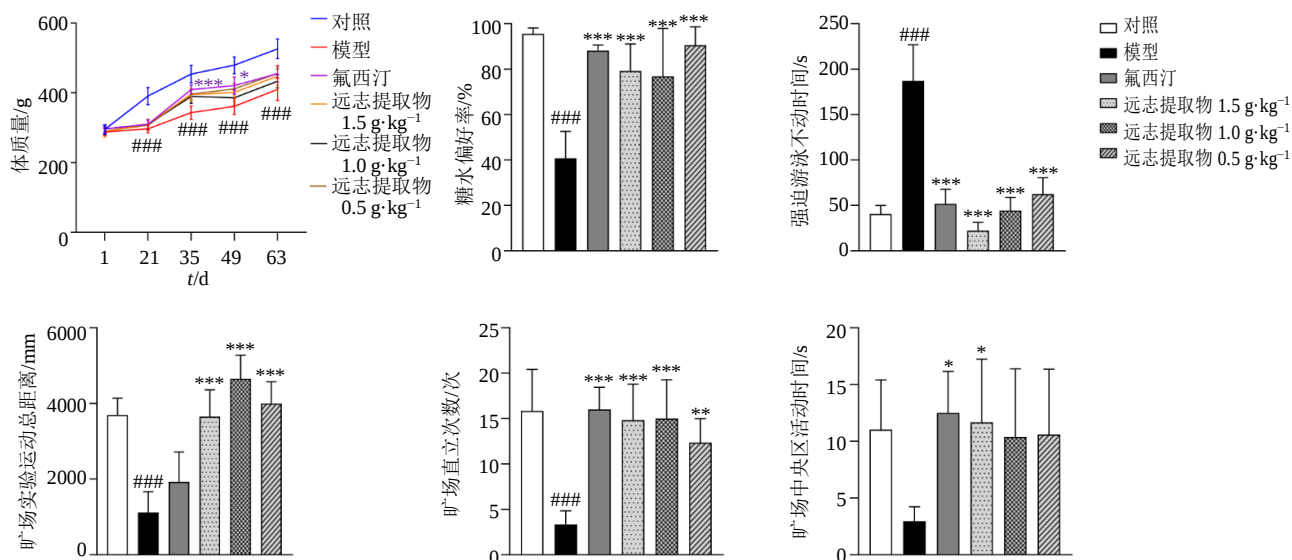
如图 2 所示, 与对照组比较, 自第 21 天开始模型组大鼠体质量显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 自第 35 天开始氟西汀组大鼠体质量明显增加 ($P < 0.05$ 、0.001), 远志提取物各剂量组大鼠体质量呈升高趋势。

3.3 远志提取物对抑郁大鼠抑郁样行为的影响

糖水偏好实验、旷场实验和强迫游泳实验分别反映了大鼠的快感缺失程度、新环境探究欲望和行为绝望程度。如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠糖水偏好率、旷场实验运动总距离和直立次数显著降低 ($P < 0.001$), 强迫游泳不动时间显著升高 ($P < 0.001$), 旷场中央区活动时间呈降低趋势; 与模型组比较, 远志提取物各剂量组大鼠糖水偏好率、旷场实验运动总距离和直立次数均显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001), 强迫游泳不动时间显著降低 ($P < 0.001$); 远志提取物高剂量组大鼠旷场中央区活动时间显著增加 ($P < 0.05$)。

3.4 远志提取物对抑郁大鼠海马中单胺类神经递质及其代谢物水平的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马 NE、5-HT、DA、DOPAC、5-HIAA 水平明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 与模型组比较, 远志提取物各剂量组大鼠海马 NE 和 5-HT 水平明显升高 ($P < 0.01$ 、0.001), 远志提取物中剂量组大鼠海马 DOPAC 和 5-HIAA 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 远志提取物低剂量组大鼠海马 5-HIAA 水平显著升高 ($P < 0.05$)。



与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$; 与模型组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$, 下图同
 $^{\#\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$ vs control group; $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ vs model group, same as belows

图 2 远志提取物对抑郁大鼠体质量、糖水偏好率、强迫游泳不动时间、旷场实验运动总距离、旷场直立次数和旷场中央区活动时间的影 响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effect of *Polygalae Radix* extract on body weight, sucrose preference rate, immobility time in forced swimming test, total movement distance, number of rearing and time spent in central area in open-field test of depression rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

表 1 远志提取物对抑郁大鼠海马中单胺类神经递质及其代谢物水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of *Polygalae Radix* extract on levels of monoamine neurotransmitters and their metabolites in hippocampus of depression rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	NE/(ng·g ⁻¹)	5-HT/(ng·g ⁻¹)	DA/(ng·g ⁻¹)	HVA/(ng·g ⁻¹)	DOPAC/(ng·g ⁻¹)	5-HIAA/(ng·g ⁻¹)
对照	—	151.50±14.70	135.81±35.16	72.08±24.74	43.89±32.61	156.41±21.29	360.32±43.68
模型	—	60.73±7.90 ^{###}	39.95±8.10 ^{###}	13.48±3.28 [#]	20.34±12.38	39.76±10.95 ^{###}	145.38±33.02 [#]
氟西汀	0.002	142.05±14.58 ^{**}	100.50±11.02 [*]	64.77±29.17 ^{**}	14.20±9.60	140.66±31.59 ^{**}	312.88±54.07
远志提取物	1.5	150.41±46.18 ^{***}	116.99±44.29 ^{**}	50.35±25.03	10.99±1.99	91.32±44.89	295.61±139.90
	1.0	165.35±38.48 ^{***}	115.92±17.21 ^{**}	51.44±29.91	24.53±9.97	132.18±67.29 [*]	387.13±137.70 ^{**}
	0.5	157.98±57.77 ^{***}	132.62±47.29 ^{***}	47.03±14.40	34.84±22.10	103.37±45.13	355.47±102.72 [*]

与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$; 与模型组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$
 $^{\#\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$ vs control group; $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ vs model group

3.5 远志提取物对抑郁大鼠 HPA 轴的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 CORT、ACTH 和 CRF 水平均显著升高 ($P<0.001$), 表明 HPA 轴功能呈亢进状态; 与模型组比较, 各给药组大鼠血清中 CORT、ACTH 和 CRF 水平均显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 表明 HPA 轴功能亢进状态得到改善。

3.6 远志提取物对抑郁大鼠血清中 IL-6 和 LPS 水平的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 IL-6 和 LPS 水平显著升高 ($P<0.001$); 与模型

组比较, 远志提取物高、中剂量组大鼠血清中 IL-6 和 LPS 水平显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 远志提取物低剂量组大鼠血清中 IL-6 水平显著降低 ($P<0.001$)。

3.7 远志提取物对抑郁大鼠十二指肠和结肠上皮超微结构的影响

如图 5 所示, 对照组大鼠十二指肠和结肠上皮的绒毛丰富有序、结构完整, 细胞间紧密连接正常; 模型组大鼠十二指肠和结肠上皮黏膜严重受损, 绒毛稀疏、萎缩甚至脱落, 细胞间紧密连接的间隙增大, 杯状细胞明显增多且呈空泡状, 排列紊乱、形

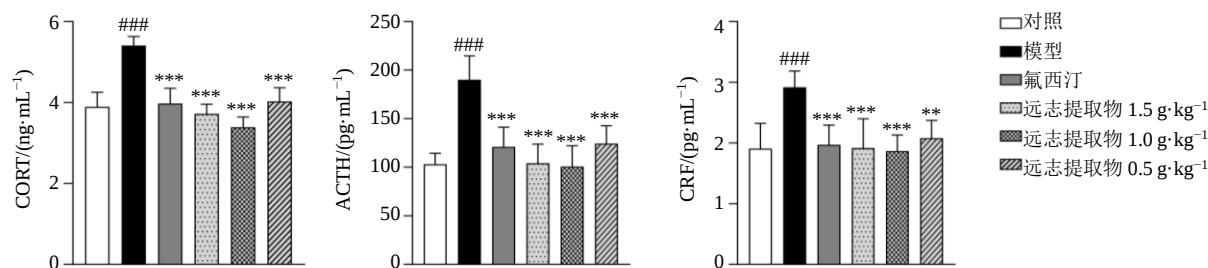
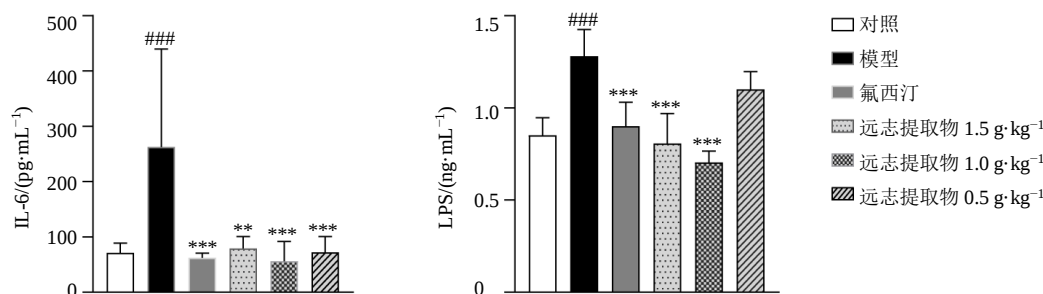
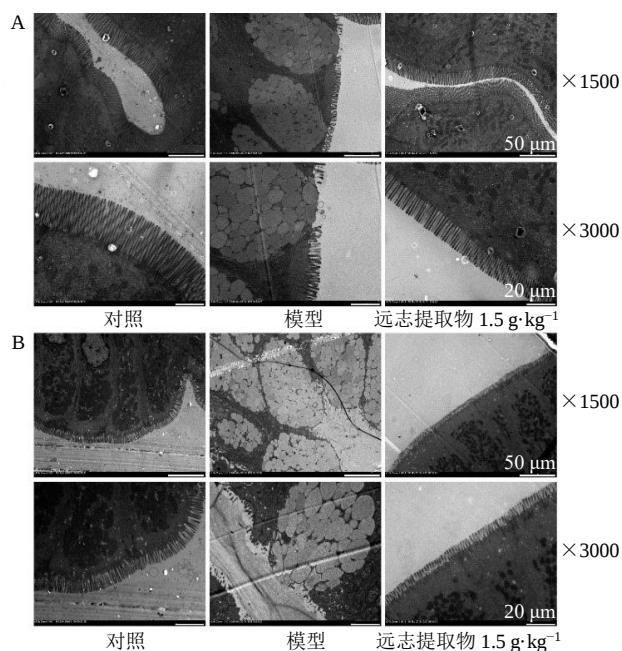
图3 远志提取物对抑郁大鼠血清中CORT、ACTH和CRF水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Fig. 3 Effect of *Polygalae Radix* extract on levels of CORT, ACTH and CRF in serum of depression rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)图4 远志提取物对抑郁大鼠血清中IL-6和LPS水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Fig. 4 Effect of *Polygalae Radix* extract on levels of IL-6 and LPS in serum of depression rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

图5 远志提取物对抑郁大鼠十二指肠(A)和结肠上皮(B)超微结构的影响

Fig. 5 Effect of *Polygalae Radix* extract on ultrastructural changes of duodenum (A) and colon epithelium (B) of depression rats

态异常,杯状细胞的黏蛋白颗粒分泌增多,颗粒缺乏包膜,主要为急性炎症表现;远志提取物高剂量组大鼠肠黏膜损伤得到改善,十二指肠和结肠上皮的绒毛致密,排列整齐、结构完整,紧密连接恢复

正常,杯状细胞较模型组减少,肠黏膜通透性降低。

3.8 大鼠肠道菌群 16S rRNA 基因测序分析

3.8.1 远志提取物对抑郁大鼠肠道菌群多样性的影响 如图6所示,与对照组比较,空白给药组大鼠的肠道菌群在属水平的 Shannon 指数无明显差异,模型组大鼠肠道菌群在属水平的 Shannon 指数显著升高 ($P<0.001$);与模型组比较,氟西汀组和远志提取物高剂量组大鼠肠道菌群在属水平的 Shannon 指数显著降低 ($P<0.001$),表明远志提取物能够降低抑郁大鼠肠道菌群丰富度和多样性。 β 多样性分析通常从计算样本之间的距离矩阵开始,以确定样本之间微生物组成结构的差异。主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA) 结果显示,模型组大鼠的肠道菌群结构与对照组明显分离,远志提取物组大鼠菌群结构偏离模型组,向对照组靠近,氟西汀组大鼠肠道菌群与对照组存在明显差异,空白给药组大鼠肠道菌群与对照组无明显差异。

3.8.2 远志提取物对抑郁大鼠肠道菌群生物分类组成的影响 如图7-A所示,在门水平上,各组大鼠粪便中厚壁菌门和拟杆菌门是最丰富的菌群。如图7-B所示,与对照组比较,模型组大鼠肠道内厚壁菌门和放线菌门相对丰度明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01),拟杆菌门和变形杆菌门相对丰度显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,远志提取物高剂量组肠

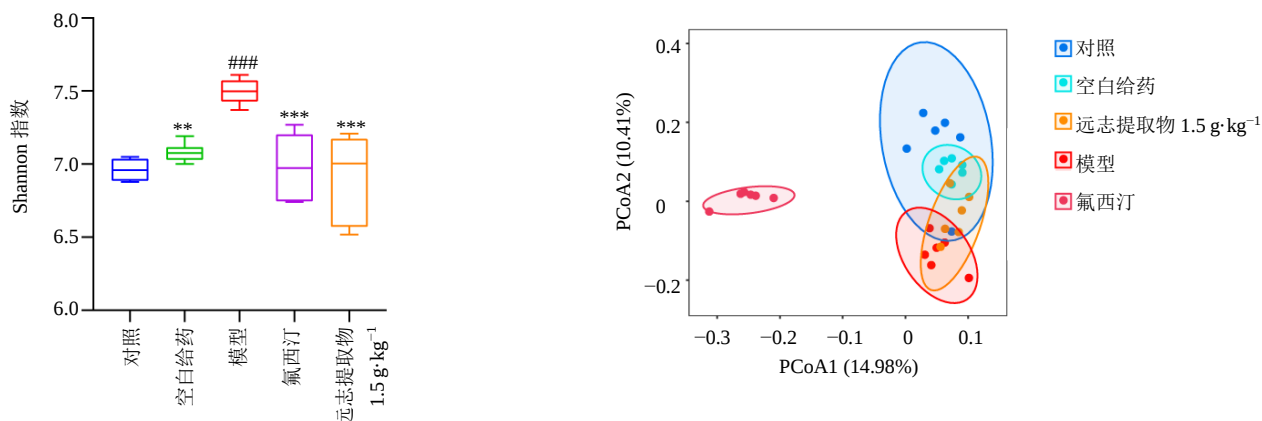


图 6 远志提取物对抑郁大鼠肠道菌群 Shannon 指数和 PCoA 的影响 ($n = 6$)

Fig. 6 Effect of *Polygalae Radix* extract on Shannon index and PCoA of gut microbiota in depression rats ($n = 6$)

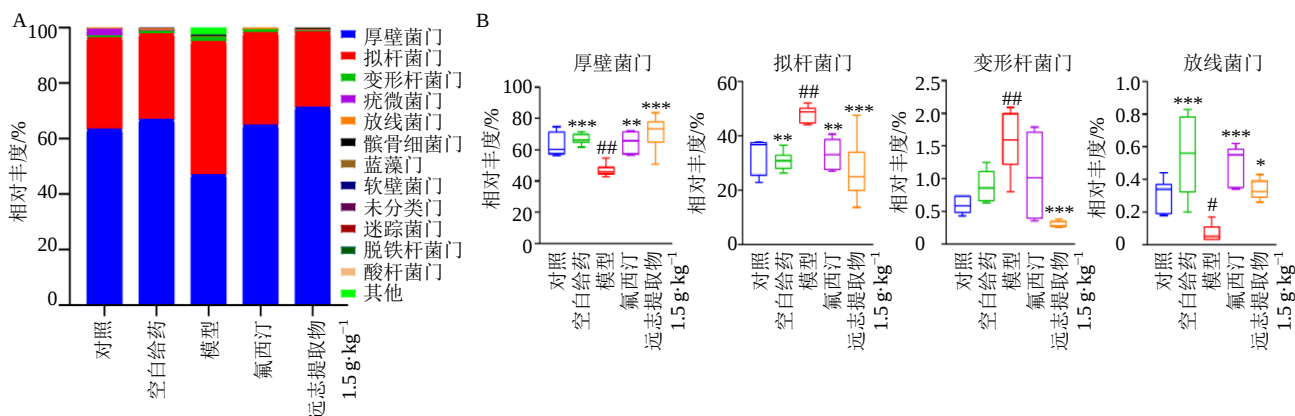


图 7 远志提取物对抑郁大鼠肠道菌群在门水平上的物种相对丰度 (A) 和显著变化菌群相对丰度 (B) 的影响 ($n = 6$)

Fig. 7 Effect of *Polygalae Radix* extract on relative abundance of gut microbiota (A) and significant changed gut microbiota (B) on phylum level of depression rats ($n = 6$)

道内厚壁菌门和放线菌门相对丰度明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)，拟杆菌门和变形杆菌门相对丰度显著降低 ($P < 0.001$)。

如图 8 所示，在科水平上，模型组大鼠的肠道菌群结构与对照组明显不同，远志提取物高剂量组大鼠的肠道菌群与对照组聚为一类，表明远志提取物高剂量组与对照组的肠道菌群结构相似性较高。与对照组比较，模型组大鼠肠道内瘤胃菌科 (*Ruminococcaceae*) 和毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*) 相对丰度明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)，S24-7 科 (*Muribaculaceae*) 和乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*) 相对丰度显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，远志提取物高剂量组大鼠肠道内瘤胃菌科和毛螺菌科相对丰度明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，S24-7 科和乳杆菌科相对丰度显著降低 ($P < 0.05$)。

如图 9 所示，在属水平上，模型组大鼠肠道菌群结构与对照组明显不同，远志提取物高剂量组与

对照组大鼠肠道菌群聚为一类，相似性较高。与对照组比较，模型组大鼠肠道内乳杆菌属 *Lactobacillus*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Ruminococcaceae_UCG_005*、*Eubacterium_coprostanoligenes_group* 和罗氏菌属 *Roseburia* 相对丰度明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)，拟杆菌属 *Bacteroides*、颤杆菌属 *Oscillibacter* 和肠单胞球菌属 *Intestinimonas* 相对丰度显著升高 ($P < 0.001$)，*Ruminococcaceae_UCG_014* 相对丰度呈降低趋势；与模型组比较，远志提取物高剂量组大鼠肠道内 *Ruminococcaceae_UCG_014*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group* 和 *Eubacterium_coprostanoligenes_group* 相对丰度明显升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)，拟杆菌属、颤杆菌属和肠单胞球菌属相对丰度显著降低 ($P < 0.001$)。

3.8.3 标志菌群分析 采用线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 在不同组间

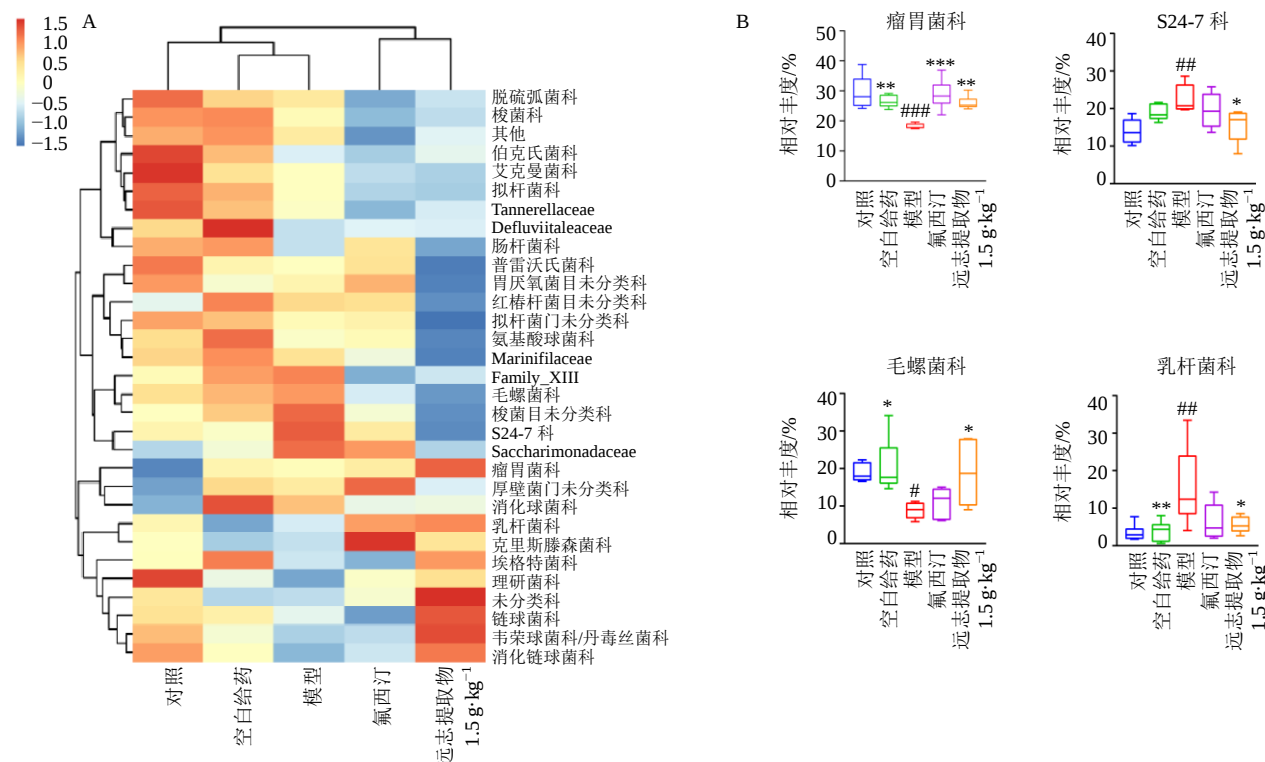


图8 远志提取物对抑郁大鼠肠道菌群在科水平上的热图分析 (A) 和显著变化菌群相对丰度 (B) 的影响 ($n = 6$)

Fig. 8 Effect of *Polygalae Radix* extract on heatmap analysis of gut microbiota (A) and significant changed gut microbiota (B) on family level of depression rats ($n = 6$)

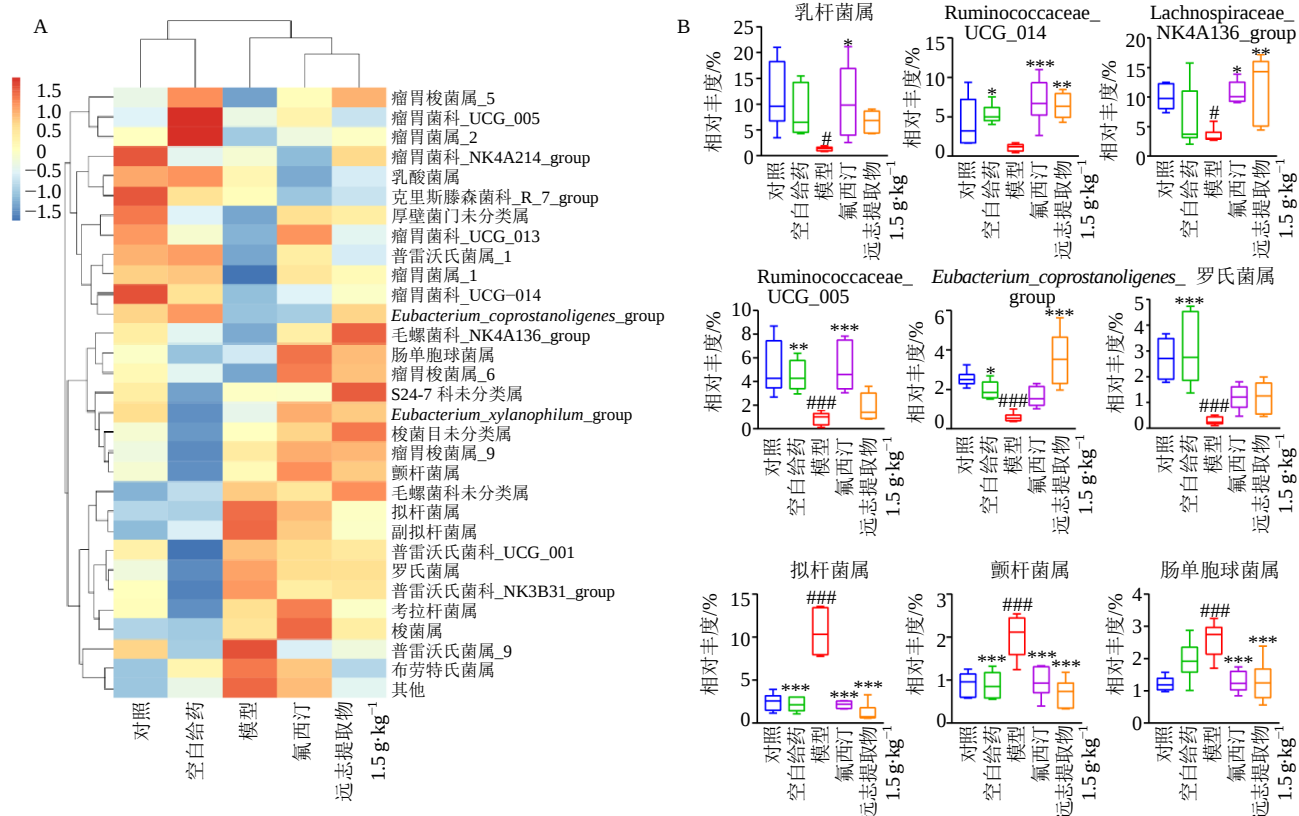


图9 远志提取物对抑郁大鼠肠道菌群在属水平上的热图分析 (A) 和显著变化菌群相对丰度 (B) 的影响 ($n = 6$)

Fig. 9 Effect of *Polygalae Radix* extract on heatmap analysis of gut microbiota (A) and significant changed gut microbiota (B) on genus level of depression rats ($n = 6$)

定位具有统计学意义的标志菌群($P < 0.01$ 、 $\lg(\text{LefSe 评分}) > 4.0$)。如图 10 所示, LefSe 分析发现了 21 个已鉴定的标志菌群, 其中 Ruminococcaceae_UCG_014 是模型组的标志菌群, Lachnospiraceae_NK4A136_group 是远志提取物高

剂量组的标志菌群。

3.8.4 肠道菌群 KEGG 分析 如图 11 所示, 与模型组比较, 远志提取物高剂量组大鼠肠道菌群的脂质代谢、脂肪酸代谢和糖代谢途径存在明显差异($P < 0.05$)。

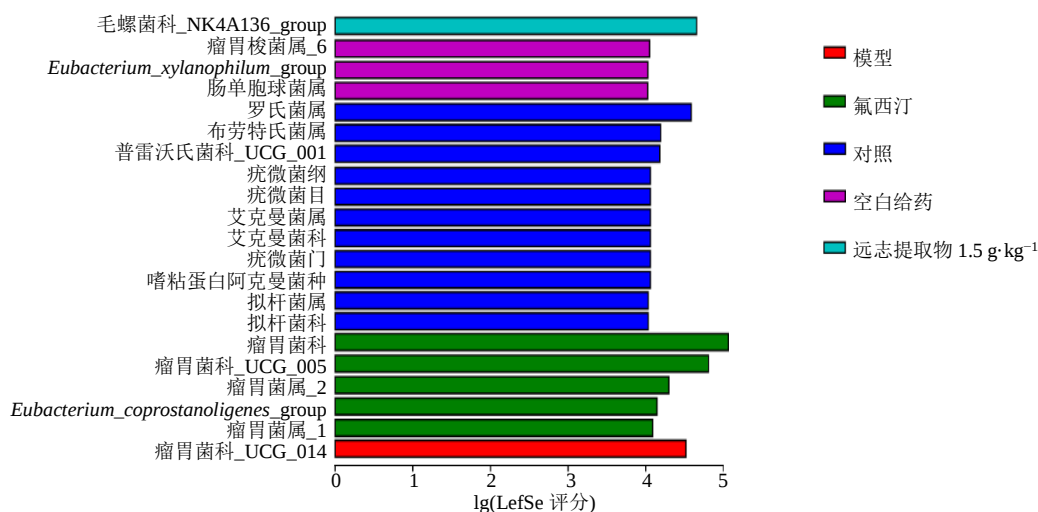


图 10 标志菌群 LefSe 分析

Fig. 10 LefSe analysis of marker flora

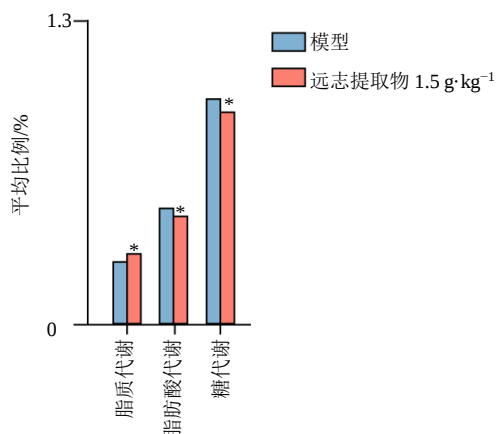


图 11 肠道菌群 KEGG 分析

Fig. 11 KEGG analysis of intestinal flora

4 讨论

抑郁症是常见的、反复发作的精神心理障碍性疾病, 其发病机制尚未完全明确。应激因素在抑郁症的发病过程中起着关键作用, 长期压力应激是形成抑郁的主要因素。本研究采用孤养结合 CUMS 方法建立抑郁大鼠模型, 大鼠随机给予多变性和不可预测性应激因子刺激, 与人类抑郁症的致病过程存在相似性。本研究结果显示, 模型组大鼠体质量降低, 表现出快感缺失、绝望行为增加、自主活动性降低以及对新环境的探索欲望降低的抑郁样行为,

海马组织中 DA、5-HT、NE、DOPAC、5-HIAA 水平明显降低, 神经递质功能减退, 并出现了 HPA 轴功能亢进; 远志提取物能够改善抑郁大鼠的抑郁样行为, 增强大鼠海马组织中单胺类神经递质水平, 并下调 HPA 轴 CORT、ACTH 和 CRF 水平, 具有良好的抗抑郁作用。此外, 本研究发现远志提取物具有调节肠道菌群的作用。在肠道菌群结构分析中, α 多样性主要用来反映菌群物种丰富度和均匀度。抑郁症患者及抑郁模型动物肠道菌群的丰富度和多样性增加^[16]。PCoA 用可视化方法直接观察了不同组别间菌群的差异, 本研究结果显示, 模型组大鼠肠道菌群结构发生显著改变, 远志提取物使大鼠肠道菌群结构更接近对照组, 与文献报道相符。

研究表明, 抑郁症患者或抑郁模型动物肠道菌群的物种组成发生显著变化; 在门水平上, 抑郁模型动物肠道内拟杆菌门和变形杆菌门相对丰度增加, 厚壁菌门和放线菌门相对丰度降低, 放线菌门可能是氯胺酮抗抑郁的标志菌群^[17-18]。本研究结果显示, 远志提取物能够显著降低抑郁大鼠肠道内拟杆菌门和变形杆菌门相对丰度, 显著升高厚壁菌门和放线菌门相对丰度, 表明远志提取物可以调节抑郁大鼠的肠道菌群组成并改善肠道菌群结构。

属水平的菌群物种组成分析结果显示, 抑郁模

型大鼠肠道内乳杆菌属、Ruminococcaceae_UCG_014、Lachnospiraceae_NK4A136_group、Ruminococcaceae_UCG_005、Eubacterium_coprostanoligenes_group 和罗氏菌属相对丰度降低,上述菌属均与维持肠屏障功能有关。其中罗氏菌属、Ruminococcaceae_UCG_014 和 Lachnospiraceae_NK4A136_group 能够产生短链脂肪酸^[19-20],短链脂肪酸是肠道菌群及其宿主肠上皮细胞的重要能量来源,能够维持肠道酸碱平衡、修复肠黏膜损伤、缓解肠道炎症反应、调节宿主肠道免疫并抑制有害病原菌生长^[21]。罗氏菌属和 Lachnospiraceae_NK4A136_group 是产生丁酸盐的主要菌属^[22-23],富含这 2 个菌属的小鼠肠上皮氧化和炎症损伤会减少^[24]。Lachnospiraceae_NK4A136_group 与维护肠屏障完整性的因素呈正相关,与结肠中的促炎因子(LPS、IL-6)呈负相关^[25];Eubacterium_coprostanoligenes_group 相对丰度越低,肠道屏障越容易被破坏^[26]。本研究发现,模型组大鼠肠道内上述肠屏障保护功能菌相对丰度减少,肠屏障功能受损,肠黏膜炎症反应加重;远志提取物能够升高抑郁大鼠肠道内上述菌群相对丰度,恢复肠屏障功能。此外,本研究发现模型组大鼠肠道内拟杆菌属和颤杆菌属相对丰度显著增加。严重抑郁症和躁郁症患者肠道内颤杆菌属相对丰度增加^[27]。拟杆菌属是一种革兰阴性菌,能够释放 LPS, LPS 在肠屏障功能受损后更易被吸收入血,进而诱导外周和中枢促炎症细胞因子释放^[28];促炎症因子在抑郁症的发病机制中起到重要的作用,抑郁症患者体内的促炎症因子水平高于健康人群^[29]。本研究结果显示,与对照组比较,抑郁模型大鼠血清中 LPS 和促炎因子 IL-6 水平显著升高;远志提取物组大鼠肠道内拟杆菌属和颤杆菌属相对丰度降低,血清中 LPS、IL-6 水平显著降低,提示远志提取物的抗抑郁作用可能与增加肠屏障保护功能菌、改善肠屏障功能,进而降低肠源性内毒素释放、减轻机体炎症水平有关。

研究表明,肠道菌群与 HPA 轴的功能和神经递质系统关系密切。HPA 轴亢进会引起皮质醇分泌增多,进而增加肠黏膜通透性并使肠道菌群组成发生变化,升高血清中 LPS 水平;将正常动物的粪菌移植到抑郁模型动物中,能够改善抑郁模型动物的 HPA 轴功能^[30]。肠道菌群不仅能够直接合成或分泌 5-HT、NE、DA 等神经递质,还能通过调节肠道上皮细胞功能影响神经递质的生成,神经递

质可能通过循环系统和迷走神经影响中枢神经递质功能^[31-32]。但远志提取物改善 HPA 轴功能、增强神经递质水平与菌群间的联系需要进一步研究。

通过 KEGG 功能代谢途径分析可知,远志提取物主要影响脂质代谢、脂肪酸代谢和糖代谢等途径,其中脂肪酸代谢途径可能与远志提取物增加抑郁大鼠肠道中能够产生短链脂肪酸的菌群相对丰度有关。不饱和脂肪酸可通过影响多种神经递质的传递过程改善海马功能,对情绪变化和抑郁症状具有调节作用^[33]。Zheng 等^[34]发现抑郁样猕猴外周和中枢鞘脂代谢失调与肠道菌群相关。研究发现,糖代谢紊乱与抑郁症相关。抑郁患者前额叶皮质葡萄糖代谢减少^[35];抑郁模型动物小肠吸收葡萄糖的能力下降^[36];抑郁大鼠骨骼肌的葡萄糖转运和糖储存功能被低血糖及胰岛素抑制^[37];抑郁大鼠丘脑葡萄糖转运体 1 和葡萄糖转运体 3 表达降低^[38]。

综上所述,远志提取物具有抗抑郁作用,能够调节抑郁大鼠肠道内菌群结构,并能改善菌群失调引起的肠屏障功能损伤、LPS 吸收入血量增加及其诱发的炎症反应。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Stubbs B, Stubbs J, Gnanaraj S D, et al. Falls in older adults with major depressive disorder (MDD): A systematic review and exploratory meta-analysis of prospective studies [J]. *Int Psychogeriatr*, 2016, 28(1): 23-29.
- [2] Wang Q, Jie W, Liu J H, et al. An astroglial basis of major depressive disorder? An overview [J]. *Glia*, 2017, 65(8): 1227-1250.
- [3] 陈姣, 楚世峰, 陈乃宏. 糖皮质激素与抑郁发病相关机制研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(11): 1493-1495.
- [4] Osadchiy V, Martin C R, Mayer E A. The gut-brain axis and the microbiome: Mechanisms and clinical implications [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17(2): 322-332.
- [5] 白宇, 胡云霞, 陈俊伟, 等. 细菌-脑-肠轴理论体系的建立 [J]. *东南大学学报: 医学版*, 2016, 35(5): 781-785.
- [6] 吴腾云, 林华军, 蒋春雷, 等. 肠道菌群紊乱所致炎症反应与抑郁症 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(36): 7175-7177, 7193.
- [7] 李梦嶝, 黄世敬. 补益药及其复方制剂抗抑郁作用研究进展 [J]. *中医学报*, 2017, 32(5): 818-823.
- [8] 谢婷婷. 远志活性部位 YZ-50 抗抑郁的物质基础及作用机制研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2007.
- [9] Hu Y, Liu P, Guo D H, et al. Antidepressant effects of the extract YZ-50 from *Polygala tenuifolia* in chronic mild stress treated rats and its possible mechanisms [J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(7): 794-800.

- [10] Jin Z L, Gao N, Zhang J R, *et al.* The discovery of Yuanzhi-1, a triterpenoid saponin derived from the traditional Chinese medicine, has antidepressant-like activity [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2014, 53: 9-14.
- [11] Chen Y, Liu X, Pan R, *et al.* Intestinal transport of 3, 6'-disinapoylsucrose, a major active component of *Polygala tenuifolia*, using Caco-2 cell monolayer and *in situ* rat intestinal perfusion models [J]. *Planta Med*, 2013, 79(15): 1434-1439.
- [12] 施琦渊. 远志质量控制及糖酯类成分的抗抑郁活性和药代动力学研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [13] 王东辉, 潘彦舒, 郭洋洋, 等. 以脑内神经递质失衡为特征的抑郁症大鼠模型的改良研究 [J]. *世界中医药*, 2018, 13(12): 3122-3125.
- [14] Song J, Zhou N, Ma W N, *et al.* Modulation of gut microbiota by chlorogenic acid pretreatment on rats with adrenocorticotrophic hormone induced depression-like behavior [J]. *Food Funct*, 2019, 10(5): 2947-2957.
- [15] 赵焕英, 段春礼, 范春香, 等. 高效液相色谱同时检测生物样本中 8 种单胺类神经递质 [J]. *分析化学*, 2009, 37(3): 330-334.
- [16] Guo Y, Xie J P, Deng K, *et al.* Prophylactic effects of *Bifidobacterium adolescentis* on anxiety and depression-like phenotypes after chronic stress: A role of the gut microbiota-inflammation axis [J]. *Front Behav Neurosci*, 2019, 13: 126.
- [17] Zhu H Z, Liang Y D, Ma Q Y, *et al.* Xiaoyaosan improves depressive-like behavior in rats with chronic immobilization stress through modulation of the gut microbiota [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108621.
- [18] Huang N N, Hua D Y, Zhan G F, *et al.* Role of Actinobacteria and Coriobacteriia in the antidepressant effects of ketamine in an inflammation model of depression [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2019, 176: 93-100.
- [19] Peng C, Xu X, Li Y, *et al.* Sex-specific association between the gut microbiome and high-fat diet-induced metabolic disorders in mice [J]. *Biol Sex Differ*, 2020, 11(1): 5.
- [20] Zhuge A X, Li B, Yuan Y, *et al.* *Lactobacillus salivarius* LI01 encapsulated in alginate-pectin microgels ameliorates D-galactosamine-induced acute liver injury in rats [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(17): 7437-7455.
- [21] 王可鑫, 姜宁, 张爱忠. 短链脂肪酸介导的宿主肠道免疫调控机制 [J]. *动物营养学报*, 2020, 32(4): 1544-1550.
- [22] Zhou S S, Xu J, Zhu H, *et al.* Gut microbiota-involved mechanisms in enhancing systemic exposure of ginsenosides by coexisting polysaccharides in ginseng decoction [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22474.
- [23] Stadlbauer V, Engertberger L, Komarova I, *et al.* Dysbiosis, gut barrier dysfunction and inflammation in dementia: A pilot study [J]. *BMC Geriatr*, 2020, 20(1): 248.
- [24] Stilling R M, van de Wouw M, Clarke G, *et al.* The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? [J]. *Neurochem Int*, 2016, 99: 110-132.
- [25] Xia T, Zhang B, Li Y, *et al.* New insight into 20(S)-ginsenoside Rh₂ against T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with the gut microbiota and the immune system [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 203: 112582.
- [26] Ye J Z, Li Y T, Wu W R, *et al.* Dynamic alterations in the gut microbiota and metabolome during the development of methionine-choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(23): 2468-2481.
- [27] Rong H, Xie X H, Zhao J, *et al.* Similarly in depression, nuances of gut microbiota: Evidences from a shotgun metagenomics sequencing study on major depressive disorder versus bipolar disorder with current major depressive episode patients [J]. *J Psychiatr Res*, 2019, 113: 90-99.
- [28] Lukiw W J. The microbiome, microbial-generated proinflammatory neurotoxins, and Alzheimer's disease [J]. *J Sport Health Sci*, 2016, 5(4): 393-396.
- [29] Sudo N, Chida Y, Aiba Y J, *et al.* Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice [J]. *J Physiol*, 2004, 558(1): 263-275.
- [30] Fung T C, Olson C A, Hsiao E Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease [J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(2): 145-155.
- [31] 刘鹏鸿, 张克让. 肠道菌群失调致抑郁症发病机制的研究进展 [J]. *中国微生态学杂志*, 2019, 31(4): 475-479.
- [32] Martin-Subero M, Anderson G, Kanchanatawan B, *et al.* Comorbidity between depression and inflammatory bowel disease explained by immune-inflammatory, oxidative, and nitrosative stress; tryptophan catabolite; and gut-brain pathways [J]. *CNS Spectr*, 2016, 21(2): 184-198.
- [33] Agrawal R, Gomez-Pinilla F. 'Metabolic syndrome' in the brain: Deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition [J]. *J Physiol*, 2012, 590(10): 2485-2499.
- [34] Zheng P, Wu J, Zhang H P, *et al.* The gut microbiome modulates gut-brain axis glycerophospholipid metabolism in a region-specific manner in a nonhuman primate model of depression [J]. *Mol Psychiatry*, 2020: 1-13.
- [35] Martin J L, Magistretti P J, Allaman I. Regulation of neurotrophic factors and energy metabolism by antidepressants in astrocytes [J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(11): 1308-1321.
- [36] 郑媛嘉, 张磊, 郭文峰. 黄芪对脾虚大鼠小肠葡萄糖吸收功能的影响及机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(6): 703-707.
- [37] 衣雪洁, 张庆荣, 于莹. 健脾补糖对过度训练脾虚大鼠骨骼肌 GLUT4 和 P38 活性的影响 [J]. *北京体育大学学报*, 2007, 30(9): 1212-1215.
- [38] 丛培玮, 尚冰, 王艳杰, 等. 脾气虚和脾阳虚模型大鼠脑肠肽与下丘脑葡萄糖转运体 1 及葡萄糖转运体 3 表达水平变化的实验研究 [J]. *中国全科医学*, 2016, 19(18): 2201-2205.

[责任编辑 李亚楠]