

[文章编号] 1000-4718(2019)07-1302-08

慢性应激模型大鼠体重、摄食变化与 粪便代谢物的相关性研究*

赵丹¹, 王少贤^{1,2Δ}, 梁文杰³, 王一旭¹, 李媛媛¹, 王坤红^{3,4}

(¹河北中医学院基础医学院, ²河北省心脑血管病中医药防治重点实验室,

³河北中医学院中西医结合学院, 河北 石家庄 050200; ⁴河北医科大学研究生学院, 河北 石家庄 050000)

[摘要] **目的:** 探讨慢性应激导致大鼠体重增长缓慢、摄食量下降与粪便代谢物变化的相关性。**方法:** 48只健康雄性SD大鼠,随机分为正常组和慢性束缚应激组。慢性束缚应激组大鼠每天给予束缚应激3 h,连续21 d;正常组大鼠正常饲养21 d,不予应激。观测2组大鼠旷场实验和高架十字迷宫实验行为学指标变化及糖水偏好率、血清D-木糖含量和小肠炭末推进率,采用¹H-NMR代谢组学技术检测大鼠粪样代谢物, Pearson相关分析探究应激大鼠体重、摄食量变化与上述观测指标的关系。**结果:** 与正常组大鼠比较,慢性束缚应激组大鼠体重增长缓慢,摄食量显著下降($P < 0.01$),5 min内在旷场内总移动距离和中央区移动距离均显著减少($P < 0.01$),内高架十字迷宫实验中5 min内在开放臂停留时间显著缩短($P < 0.01$)。束缚应激21 d大鼠血清D-木糖含量和糖水偏好率均较正常大鼠显著下降($P < 0.05$)。小肠炭末推进率在两组间比较差异无统计学显著性($P > 0.05$)。粪样代谢组学检测获得乙酸盐、丁酸盐、葡萄糖、丙酸盐、谷氨酸盐、核糖、庚二酸盐、乳酸盐、丙氨酸和戊酸盐10种差异代谢物,且慢性束缚应激组大鼠粪样中含量显著高于正常组大鼠($P < 0.05$)。Pearson相关分析提示应激21 d大鼠摄食量与差异代谢物乙酸盐和庚二酸盐呈显著负相关($P < 0.05$),体重变化与上述指标均无显著相关性。**结论:**慢性束缚应激大鼠粪便小分子代谢产物乙酸盐和庚二酸盐与其摄食量存在一定相关性,但具体代谢通路有待进一步研究。

[关键词] 慢性束缚应激; 体重; 摄食量; 代谢组学; 核磁共振氢谱

[中图分类号] R749; R363.2

[文献标志码] A

doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.07.024

Correlation between fecal metabolites and body weight/food intake in rats after chronic immobilization stress

ZHAO Dan¹, WANG Shao-xian^{1,2}, LIANG Wen-jie³, WANG Yi-xu¹, LI Yuan-yuan¹, WANG Kun-hong^{3,4}

(¹School of Preclinical Medicine, Hebei University of Chinese Medicine, ²Key Laboratory of Cardio-cerebrovascular Diseases Treated with Chinese Medicine of Hebei Province, ³College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; ⁴Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China. E-mail: muhudie@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To explore the correlation between fecal metabolites and body weight/food intake in rats after chronic immobilization stress (CIS). **METHODS:** Healthy male Sprague-Dawley (SD) rats ($n = 48$) were randomly divided into control group and CIS group. The rats in CIS group were subjected to 3 h of immobilization stress a day for 21 consecutive days, and the rats in control group were kept for 21 d without stress intervention. The behaviors in open-field test (OFT) and elevated plus-maze test (EPM test), the sucrose consumption, the serum D-xylose content, and the small bowel transit rate were detected. The fecal metabolites were determined by ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR) technique, and differential metabolites in the rats of 2 groups were analyzed by multivariate statistics. The correlation between body weight/food intake and above indexes of CIS rats were observed by Pearson correlation analysis. **RESULTS:** Compared with the control rats, the body weight of CIS rats was increased slowly and the food intake was decreased significantly ($P < 0.01$). In the OFT, both the total and central distance covered in CIS rats were reduced signifi-

[收稿日期] 2019-02-15

[修回日期] 2019-05-15

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81673881; No. 81202644); 河北省自然科学基金资助项目 (No. H2016423049)

Δ通讯作者 Tel: 0311-89926256; E-mail: muhudie@163.com

cantly than those in control group within 5 min ($P < 0.01$). In the EPM test, the residence time in open-arms of CIS rats within 5 min was shortened dramatically than those in the control group ($P < 0.01$). The content of serum D-xylose and the sucrose consumption of the rats after stress for 21 d were decreased markedly ($P < 0.05$). The small bowel transit rate of CIS rats was lower than that of control rats, but no statistical difference was observed ($P > 0.05$). Acetate, butyrate, glucose, propionate, glutamate, ribose, pimelate, lactate, alanine, valerate, total 10 kinds of differential metabolites in fecal samples were detected, and the 10 kinds of metabolites in CIS rats were higher than that of the control rats ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that food intake of CIS rats was negatively correlated with metabolites of acetate and pimelate ($P < 0.05$), and no correlation between body weight and above indexes was found. **CONCLUSION:** Under the CIS condition, there are certain correlations between food intake and metabolites of acetate and pimelate, but the mechanism still need further study.

[KEY WORDS] Chronic immobilization stress; Body weight; Food intake; Metabolomics; ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy

心理应激不但可引发抑郁、焦虑和恐惧等情绪障碍,体重下降和摄食量减少也成为慢性持续应激刺激机体出现的常见反应。神经、免疫、内分泌、消化、心血管和生殖等系统共同参与调节应激反应,机体通过适当调节各系统代谢,可有效对应激损伤^[1]。代谢组学是一种研究机体在受到环境、行为和病理等不同因素刺激后,对体内小分子代谢产物变化进行系统测量和分析的方法,可以揭示外源性刺激引起内源性代谢产物的变化规律^[2-3]。近20年,代谢组学技术已被成熟应用于动物实验研究。相关学者已从慢性温和和不可预知应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)或慢性束缚应激大鼠尿、血和海马组织等样本中,发现了与抑郁有关的小分子代谢产物^[4-8]。极少量文献报道采用代谢组学技术研究 CUMS 模型大鼠粪便中代谢产物变化规律,并评价其与抑郁情绪的相关性^[9],但应激大鼠摄食量、体重变化与粪样代谢产物相关性研究尚未见报道。

本研究观察了慢性应激模型大鼠摄食量和体重变化,动物在旷场实验和高架十字迷宫实验中的行为学改变及糖水偏好、血清 D-木糖含量和小肠炭末推进率,并采用基于核磁共振氢谱(^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy, ^1H -NMR)的代谢组学技术和多元统计检测分析慢性应激大鼠与正常大鼠粪样差异代谢物,探讨慢性应激导致其体重和摄食量变化的机制。

材 料 和 方 法

1 动物

实验动物购自北京维通利华实验动物技术有限公司,6~7周龄,体重180~200 g,雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只,SPF 级,动物合格证号为 SCXK(京)2016-0006。清洁级动物房饲养,室内温度 20~22 °C,昼夜明暗交替时间 12/12 h(7:00 ~

19:00 为明期,19:00~7:00 为暗期),相对湿度 40%~50%。实验程序通过河北中医学院实验动物伦理委员会批准,尽可能将实验动物的痛苦和数量降低到最小。

2 试剂与仪器

D-木糖购自 Biotopped Science&Technology;血清 D-木糖检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;核磁共振标准品 Anachro Certified DSS Standard Solution (ACDSS) 购自 CIL; Amicon[®] ULTRA 3 kDa 超滤膜购自 Millipore。SpectraMax[®] Plus 384 读板机(酶标仪)购自 MD;XP205 分析天平购自 Mettler-Toledo; Centrifuge 5415R 和 5424R 高速冷冻离心机购自 Eppendorf; Bruker AV III 600 MHz 型核磁共振(NMR)谱仪购自 Bruker; Sonics VCX130 超声波破碎仪购自 Sonics & Materials。

3 方法

3.1 动物分组与模型制备 48 只大鼠适应喂养 1 周,随机分为正常组(control 组)和慢性束缚应激组(stress 组),每组 24 只大鼠,每 4 只大鼠 1 笼,每组 6 笼。参考课题组之前发表文献^[10-13]方法,慢性束缚应激组每天 3 h,连续 21 d 将大鼠捆绑于特制 T 型束缚木架,正常组大鼠常规饲养 21 d。

3.2 大鼠摄食量和体重检测 在束缚应激前,称量大鼠体重和摄食量作为第 0 天(day 0)数据,应激后每 3 d 称量 1 次大鼠体重和摄食量,即 day 3、day 6、day 9、day 12、day 15、day 18 和 day 21 各称量 1 次,共计 8 次。当日摄食量 = 前一日给食量 - 当日剩余食量。

3.3 行为学实验 旷场箱底面积 100 cm × 100 cm,被平分为 25 小方格,最中心 9 个小方格组成中央区。高架十字迷宫结构:长 45 cm × 宽 15 cm 的开放臂 2 条,长 45 cm × 宽 15 cm × 高 30 cm 的封闭臂 2 条,一个联结 4 条臂的中央平台(15 cm × 15 cm),封闭臂顶部开放,开放臂与封闭臂呈十字形。

由 SuperMaze 动物行为学视频分析系统,以 5 min 为计时单位,记录束缚应激前 day 0 和应激开始后 day 7 和 day 21 两组大鼠行为学指标变化。旷场实验行为学指标包括大鼠在旷场箱内总移动距离和中央区移动距离。高架十字迷宫行为学指标包括大鼠进入 2 条开放臂和 2 条封闭臂次数和停留时间。

3.4 糖水偏好实验 根据文献^[14],先对大鼠进行训练(以笼为单位):撤掉一直饮用的纯净水(淡水),先予 2 瓶 1% 蔗糖溶液(糖水)自由饮用 24 h,然后换成 1 瓶糖水和 1 瓶淡水自由饮用 24 h,之后禁食禁水 24 h,训练结束,即刻正式开始实验。予 1 瓶糖水和 1 瓶淡水给大鼠自由饮用 1 h,记录糖水和淡水消耗量(mL),糖水偏好率(%) = 糖水消耗量/(糖水 + 淡水消耗量) × 100%。分别在应激前 day 0、应激后 day 7 和 day 21 记录 3 次糖水偏好率。

3.5 血清 D-木糖含量测定 实验结束,大鼠禁食 12 h,每组随机选取 12 只大鼠灌服 5% D-木糖溶液 2 mL,1 h 后予 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,断头取血 2 mL,4℃ 离心 10 min,相对离心力 1 041 × g,分离血清,根据试剂盒说明采用间苯三酚法检测大鼠血清 D-木糖含量,其中正常组取 3 只未服 D-木糖大鼠血清备用空白管检测。

3.6 小肠炭末推进率检测 取材前 25 ~ 30 min,每组 10 只大鼠灌胃 10% 炭粉混悬液 2 mL,麻醉断头处死大鼠后,快速取出胃和小肠,将小肠自然平铺,测量自幽门括约肌至回肠末端全段小肠长度和炭末在小肠内的推进距离,计算小肠炭末推进率(%) = 炭末推进距离/小肠全长 × 100%。

3.7 基于¹H-NMR 技术的粪样代谢组学检测 实验结束,每组采集 10 只大鼠粪便,各称量 50 mg 冻干粪样,加入 1 000 μL 纯水,涡旋 1 min,冰水浴超声萃取 32 s,相对离心力 14 360 × g,4℃ 离心 15 min,然后超滤膜离心过滤 45 min;取滤液 450 μL,加入核磁共振标准品 ACDSS 50 μL 涡旋 10 s,相对离心力 14 360 × g,离心 2 min,取 480 μL 上清于核磁共振管中,Bruker AV III 600 MHz 谱仪 2D-¹H NOESY 脉冲序列采集¹H-NMR 数据。

参考文献^[15]方法,将¹H-NMR 信号导入软件 Chenomx NMR 套装 8.1 版本(Chenomx),通过校正基线,调整谱图峰形,比对分析,最终获得 20 份大鼠粪样的小分子代谢物和浓度值。并采用偏最小二乘法判别分析(partial least square-discriminant analysis, PLS-DA)模型进行多元统计分析,获得差异代谢物数据和图示。采用交叉验证(cross-validation, CV)对 PLS-DA 判别分析模型质量进行检验,模型的分类效

果采用置换检验来评价,结果均表明所采用模型质量稳定可靠,分类效果较好。

4 统计学方法

以 SPSS 22.0 的一般线性模型(general linear model, GLM)的球形检验(Mauchly's test of sphericity)首先对 2 组大鼠体重、摄食量、行为学和糖水偏好率不同时间重复测量数据进行相关性分析,如果时间、时间与分组交互、分组因素效应显著,有统计学意义($P < 0.05$),则每个时点的组间差异采用单因素方差分析,组内不同时间比较采用重复测量数据多重比较配对的 *t* 检验法(Bonferroni 法;由于每组内各个时点上的两两比较结果输出内容较多,可结合均数图直观观察到 2 组大鼠体重、摄食量、行为学指标随时间的变化趋势,所以省略每组之内在各个时点上的两两比较);2 组大鼠血清 D-木糖含量、小肠炭末推进率比较采用成组 *t*-test 分析;指标之间相关性采用 Pearson 相关分析。资料均以均数 ± 标准误(mean ± SEM)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 体重和摄食量变化

在束缚应激前,2 组大鼠皮毛光泽,活动自如,体重和摄食量差异均无统计学显著性($P > 0.05$);应激因素施加 1 ~ 4 d,大鼠反抗剧烈,频繁挣脱束缚;至束缚应激第 2 周,大鼠反抗和挣脱能力逐渐下降,体重较正常组大鼠增长缓慢,摄食量显著下降($P < 0.01$);在束缚应激最后 1 周,大鼠基本无反抗和挣脱,体重和摄食量较正常大鼠呈持续下降趋势($P < 0.01$),见表 1。

2 行为学变化

2.1 旷场实验(open-field test, OFT) 实验前,2 组大鼠 5 min 在旷场内总移动距离和中央区移动距离差异无统计学显著性($P > 0.05$)。在实验第 7 天和第 21 天,应激大鼠 5 min 总移动距离和在中央区移动距离均较正常组大鼠显著减少($P < 0.01$),见表 2。

2.2 高架十字迷宫实验(elevated plus-maze test, EPM test) 束缚应激前,高架十字迷宫实验 5 min 内 2 组大鼠在开放臂和封闭臂停留时间和进入次数差异均无统计学显著性($P > 0.05$)。在束缚应激第 7 天和 21 天,5 min 内应激大鼠在开放臂停留时间较正常大鼠显著缩短($P < 0.01$),虽然进入开放臂次数有所减少,但组间比较差异无统计学显著性($P > 0.05$);应激第 21 天大鼠进入封闭臂次数显著减少($P < 0.01$)但停留时间延长,2 组封闭臂停留时间比较差异亦无统计学显著性($P > 0.05$),见表 3。

表 1 2 组大鼠体重和摄食量比较

Table 1. Changes of body weight and food intake in two groups (g. Mean \pm SEM)

Time	Body weight ($n = 24$)		Food intake ($n = 6$)	
	Control	Stress	Control	Stress
Day 0	267.706 \pm 1.983	270.282 \pm 2.963	34.450 \pm 0.978	35.067 \pm 1.073
Day 3	290.956 \pm 2.740	269.818 \pm 2.463 **	33.483 \pm 0.893	26.017 \pm 0.611 **
Day 6	315.844 \pm 2.993	285.541 \pm 2.997 **	31.300 \pm 0.418	24.700 \pm 0.602 **
Day 9	336.319 \pm 3.854	296.106 \pm 3.814 **	31.567 \pm 1.179	23.433 \pm 0.750 **
Day 12	351.138 \pm 4.073	303.612 \pm 3.812 **	30.383 \pm 0.957	22.867 \pm 0.791 **
Day 15	368.275 \pm 4.385	314.747 \pm 3.767 **	29.550 \pm 0.944	22.183 \pm 0.524 **
Day 18	383.481 \pm 5.452	324.788 \pm 4.584 **	29.933 \pm 0.919	22.433 \pm 1.021 **
Day 21	399.138 \pm 5.483	339.394 \pm 4.235 **	29.250 \pm 0.845	22.633 \pm 1.060 **

** $P < 0.01$ vs control group.

表 2 2 组大鼠在旷场内总移动距离和中央区移动距离比较

Table 2. The total and central distance covered of two groups in the OFT (cm. Mean \pm SEM. $n = 20$)

Time	Total distance covered		Central distance covered	
	Control	Stress	Control	Stress
Day 0	3 168.241 \pm 266.566	3 288.816 \pm 162.150	1 204.612 \pm 101.011	977.036 \pm 117.576
Day 7	2 543.117 \pm 221.883	1 466.082 \pm 179.254 **	795.932 \pm 107.324	281.212 \pm 34.726 **
Day 21	2 715.736 \pm 227.893	1 724.281 \pm 159.332 **	840.027 \pm 98.872	297.039 \pm 29.711 **

** $P < 0.01$ vs control group.

表 3 高架十字迷宫实验 2 组大鼠行为学指标比较

Table 3. Behavior changes of two groups in the EPM test (Mean \pm SEM. $n = 20$)

Time	Residence time in open-arms (s)		Enter times in open-arms		Residence time in closed-arms (s)		Enter times in closed-arms	
	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress
Day 0	38.486 \pm 5.516	32.803 \pm 4.108	9.546 \pm 1.186	9.333 \pm 1.190	216.431 \pm 10.566	225.813 \pm 13.267	15.636 \pm 1.586	16.286 \pm 1.928
Day 7	31.112 \pm 5.215	9.211 \pm 1.554 **	6.636 \pm 0.993	5.222 \pm 0.940	230.147 \pm 16.834	290.581 \pm 23.688 *	13.636 \pm 1.337	8.786 \pm 1.523
Day 21	25.106 \pm 3.103	8.221 \pm 2.221 **	5.909 \pm 1.091	3.778 \pm 0.703	254.977 \pm 14.098	286.084 \pm 15.355	10.818 \pm 0.807	5.786 \pm 0.585 **

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

3 糖水偏好实验

应激前,2 组大鼠对糖水的偏好差异无统计学显著性 ($P > 0.05$),而束缚应激能够降低大鼠对糖水的偏好,应激 21 d 时,2 组差异显著 ($P < 0.05$),见表 4。

表 4 2 组大鼠糖水偏好率比较

Table 4. The sucrose consumption in two groups (%. Mean \pm SEM. $n = 6$)

Time	Control	Stress
Day 0	24.198 \pm 2.086	26.393 \pm 2.399
Day 7	19.524 \pm 2.936	13.822 \pm 1.321
Day 21	21.011 \pm 2.624	13.024 \pm 2.029 *

* $P < 0.05$ vs control group.

4 血清 D-木糖含量和小肠炭末推进率测定

应激 21 d 大鼠血清 D-木糖含量较正常组大鼠

显著下降 ($P < 0.01$),小肠炭末推进率低于正常大鼠,但组间比较差异无统计学显著性 ($P > 0.05$),见图 1。

5 大鼠粪样¹H-NMR 代谢组学结果

经过对大鼠粪样谱图信号与 Chenomx 自带数据库进行比对分析,最终获得 58 种代谢物,主要包括氨基酸及其分解产物、胺及其化合物、有机酸类、糖类、醇类和核酸成分共 6 类。初步分析慢性束缚应激组 1 个样本与同组差异较大的被剔除,最终 10 个正常组粪便样本和 9 个慢性束缚应激组样本数据被纳入统计。首先采用 Pareto Scaling 法对 2 组代谢物数据进行归一化,然后采用 PLS-DA 进行多元统计分析,最终获得得分图 (Scores plot)、载荷图 (Loading plot)、VIP (Variable Importance in Projection) 图、VIP 值 > 1 差异代谢物 t -test 图,见图 2。

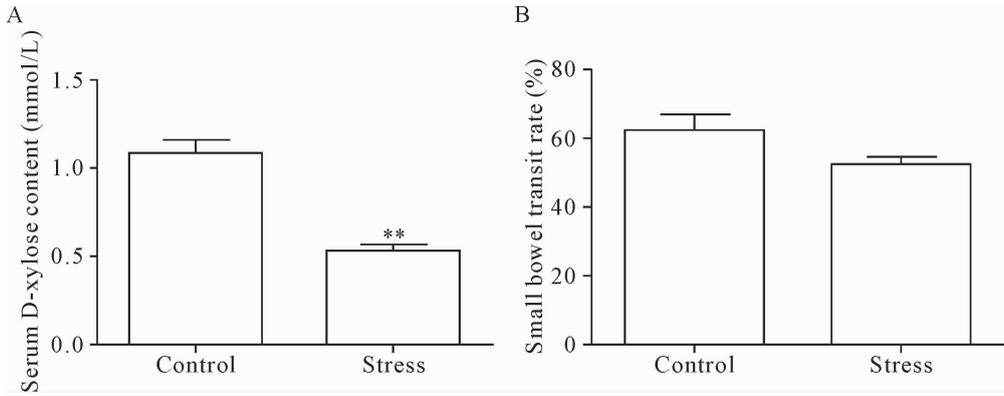


Figure 1. The serum D-xylose content and small bowel transit rate in two groups. A: the serum D-xylose content in two groups. $n = 12$. B: the small bowel transit rate in two groups. $n = 10$. Mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ vs control group.

图1 2组大鼠血清D-木糖含量和小肠炭末推进率比较图

PLS-DA 的 VIP 图,默认 VIP 值 > 1 的变量(代谢物)差异具统计学显著性。本研究 VIP 值 > 1 的代谢物包括乙酸盐(acetate)、丁酸盐(butyrate)、葡萄糖(glucose)、丙酸盐(propionate)、谷氨酸盐(glutamate)、核糖(ribose)、庚二酸盐(pimelate)、乳酸盐(lactate)、丙氨酸(alanine)和戊酸盐(valerate)共 10 种,2 组间比较,慢性束缚应激组高于正常组,进行 t -test 分析差异均有统计学显著性($P < 0.05$),见图 2D、表 5。

表 5 2 组大鼠粪样 VIP 值 > 1 的差异代谢物含量比较

Table 5. Differential metabolites level (VIP value > 1) in the two groups (mg/g. Mean \pm SEM)

Metabolites	Control ($n = 10$)	Stress ($n = 9$)
Acetate	3.1992 \pm 0.3630	5.3237 \pm 0.2253 **
Butyrate	0.7705 \pm 0.0949	2.4143 \pm 0.2565 **
Glucose	0.8098 \pm 0.0835	2.3648 \pm 0.4151 **
Propionate	1.2010 \pm 0.1029	1.8864 \pm 0.0554 **
Glutamate	0.5547 \pm 0.1291	1.3528 \pm 0.2400 *
Ribose	0.5483 \pm 0.0665	0.9942 \pm 0.1143 **
Pimelate	0.1089 \pm 0.0144	0.3816 \pm 0.0730 **
Lactate	0.0855 \pm 0.0090	0.3322 \pm 0.0531 **
Alanine	0.1755 \pm 0.0308	0.4456 \pm 0.0775 **
Valerate	0.1946 \pm 0.0240	0.3993 \pm 0.0462 **

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

6 慢性应激大鼠体重、摄食量、血清 D-木糖含量、糖水偏好率、小肠炭末推进率和差异代谢物相关性分析

Pearson 相关分析表明,应激大鼠体重与摄食量、血清 D-木糖含量、小肠炭末推进率、糖水偏好率和差异代谢物相关性均不显著($P > 0.05$);摄食量与粪样差异代谢物中 acetate 和 pimelate 呈显著负相关($P <$

0.05);小肠炭末推进率与 pimelate 和 lactate 呈显著负相关($P < 0.05$),见表 6。

讨 论

心理应激研究目前多着重于应激引发的抑郁、焦虑等情绪障碍^[16-17],但对于其导致的体重增长缓慢、食欲下降等机制研究尚不足。束缚制动是目前制备心理应激动物模型的经典方法之一^[18-19]。糖水偏好实验可有效评价动物抑郁情绪的特征表现^[20]。实验大鼠在旷场箱和高架十字迷宫中的自主行为、探究行为,以及探究与回避的矛盾冲突行为,是评价动物紧张、焦虑、抑郁行为的经典方法^[21-22]。本研究结果表明,与正常大鼠比较,应激大鼠 5 min 内在旷场箱活动距离减少,进入高架十字迷宫开放臂次数和停留时间均减少,而在封闭臂停留时间增加,应激第 21 天大鼠对糖水的偏好程度也显著下降,说明慢性束缚应激导致实验大鼠探究性行为减少,自主行为活动能力下降,逐渐出现紧张、抑郁、焦虑等不良情绪。与课题组前期报道^[23-24]和国内外相关文献研究结果一致^[25-27]。

在实验过程中,伴随应激时间增加,我们观察到应激大鼠出现体重增长缓慢,摄食量减少,血清 D-木糖含量下降,小肠炭末推进率降低,说明束缚应激不但引发实验动物出现了情绪障碍,胃肠动力和吸收功能也出现下降。但分析血清 D-木糖含量和小肠炭末推进率与大鼠体重、摄食量之间并无显著相关性,说明束缚应激大鼠胃肠动力和吸收能力改变,并非是导致其体重、摄食量变化的直接因素,机体的代谢水平可能在其中发挥一定作用^[13]。

采用¹H-NMR 代谢组学技术检测慢性束缚应激大鼠血清中不饱和脂肪酸、血糖、高密度脂蛋白等化合物含量较正常大鼠明显降低^[8]。本研究采用同样

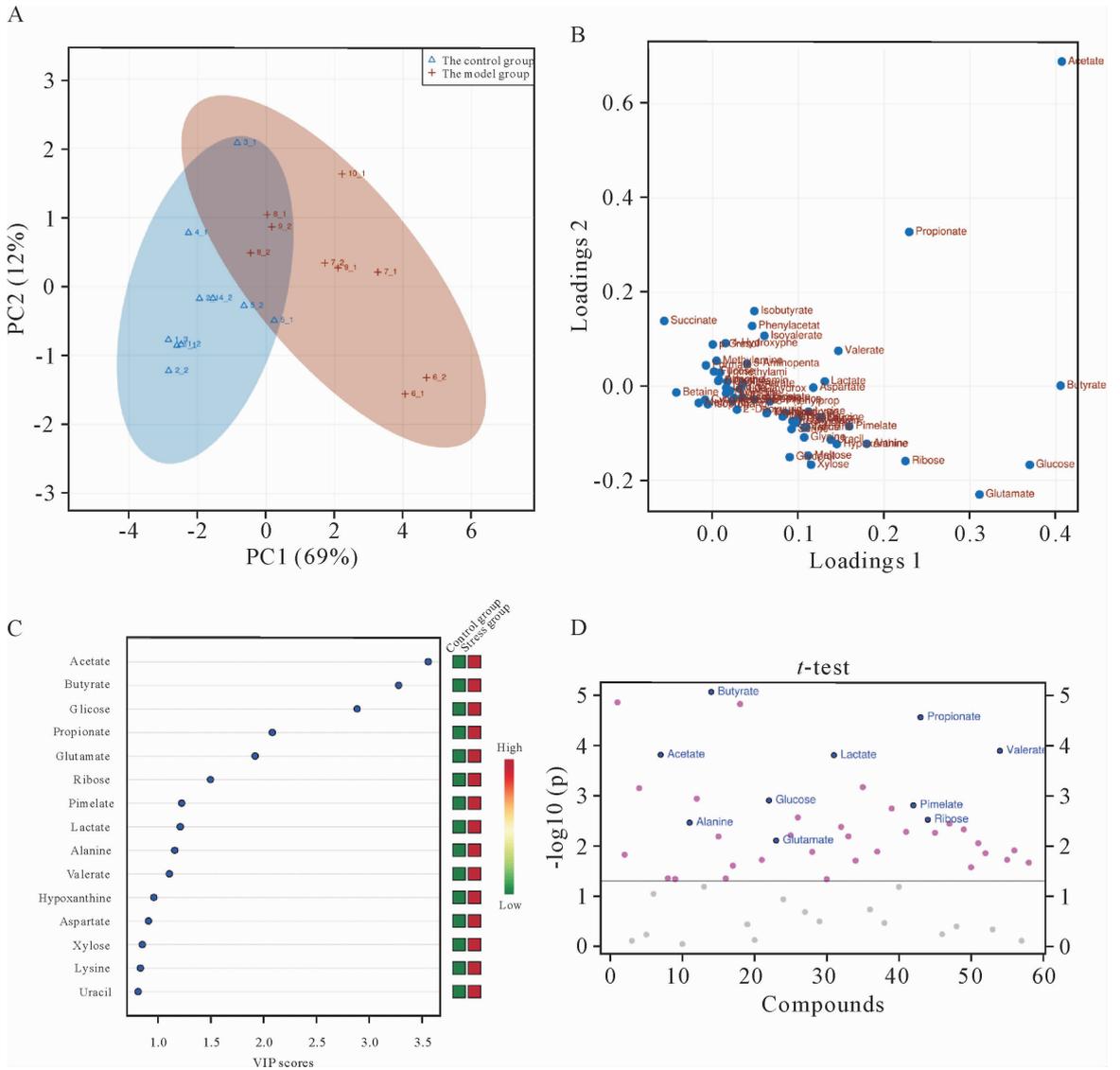


Figure 2. PLS-DA analysis of metabolites between two groups. The scores plot (A), the loading plot (B), the VIP plot (C) of PLS-DA analysis between two groups, and the statistical analysis plot(D) for metabolites (VIP value >1) obtained from PLS-DA with *t*-test. *n* = 10 in the control group, and *n* = 9 in the stress group. In figure 2D, the dotted line represents the threshold line of *P* = 0.05, the metabolites of *P* > 0.05 are marked with gray points, the metabolites of *P* < 0.05 are marked with red points, and the metabolites of the VIP value > 1 obtained by PLD-DA analysis are marked with blue points.

图2 2组大鼠粪样代谢物 PLS-DA 分析图

应激方法,大鼠粪便中葡萄糖、核糖含量水平明显高于正常大鼠。提示应激大鼠肠道对糖类吸收功能明显下降,体内存在严重的糖类和能量代谢紊乱。短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)作为营养物质被吸收,可为肠上皮细胞提供主要能量来源,维持肠道上皮细胞的完整性和正常功能,对抗炎症,调节免疫反应和肠道菌群平衡等^[28-30]。本研究应激大鼠粪便中以乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐为主要成分的 SCFAs 盐类排出量明显增多,说明长期慢性应激不但影响了肠道的能量代谢,还影响了肠上皮细胞的结构和功能,出现肠道免疫功能的下降等。乳酸为关键的能量载体^[31-32],应激大鼠粪便排出乳酸盐增多,说

明机体存在能量代谢紊乱,与相关研究结果一致^[9]。谷氨酸、丙氨酸与蛋白质氨基酸代谢有关。有研究表明,谷氨酸缺乏是引起肠黏膜萎缩的主要原因,丙氨酸在内脏氮循环中起着重要作用,可通过影响谷氨酰胺、一氧化氮的生成,使小肠绒毛萎缩,肠壁变薄,小肠完整性和免疫功能降低^[33];同时丙氨酸可通过丙氨酸-葡萄糖循环参与葡萄糖代谢,具有显著的免疫和生糖作用。本研究中,应激大鼠粪样中丙氨酸、谷氨酸盐排出增多,推测体内丙氨酸、谷氨酸吸收不足,蛋白质氨基酸代谢紊乱,能量代谢异常,肠道的完整性和免疫功能受到影响。

表 6 慢性束缚应激大鼠体重和摄食量与其它指标相关性

Table 6. Correlation between body weight/food intake with the other indexes in the stress group

Index	Body weight	Food	Serum D-xylose content	Small bowel transit	Sucrose consumption	Acetate	Alanine	Butyrate	Glucose	Glutamate	Lactate	Pimelate	Propionate	Ribose	Valerate
Bodyweight	1														
Food	0.234	1													
Serum D-xylose content	0.236	-0.400	1												
Small bowel transit rate	0.095	0.614	-0.244	1											
Sucrose consumption	-0.460	-0.048	0.282	-0.199	1										
Acetate	-0.260	-0.819 *	0.161	-0.323	0.223	1									
Alanine	-0.435	-0.610	0.454	-0.294	0.769	0.277	1								
Butyrate	-0.520	-0.784	0.461	-0.314	0.615	0.303	0.825 **	1							
Glucose	-0.117	-0.289	0.430	0.243	0.451	0.096	0.350	0.631	1						
Glutamate	-0.356	-0.622	0.465	-0.206	0.776	0.324	0.972 **	0.730 *	0.365	1					
Lactate	-0.385	-0.440	0.073	-0.711 *	0.335	0.087	0.603	0.565	-0.212	0.432	1				
Pimelate	-0.456	-0.832 *	0.269	-0.812 *	0.392	0.119	0.706	0.858 **	0.103	0.570	0.863 **	1			
Propionate	0.003	-0.795	0.260	-0.634	0.411	0.699 *	0.173	0.123	0.040	0.249	0.072	0.293	1		
Ribose	-0.482	-0.605	0.464	-0.417	0.775	0.332	0.982 **	0.797 *	0.282	0.953 **	0.635	0.739 *	0.305	1	
Valerate	-0.384	-0.754	0.300	-0.389	0.622	0.864 **	0.656	0.683 *	0.385	0.655	0.351	0.448	0.603	0.678 *	1

* P < 0.05, ** P < 0.01.

研究结果提示,应激大鼠体内不仅存在胃肠动力和吸收功能下降,更存在能量代谢异常、蛋白质氨基酸代谢紊乱。而应激大鼠摄食量与粪样代谢物 acetate 和 pimelate 呈显著负相关,说明 acetate 和 pimelate 变化及其相关代谢途径的改变,可能是慢性束缚应激引起大鼠摄食量变化机制之一,相关研究在文献中未见报道。但体重变化与粪样代谢物相关性不明确,其机制有待进一步研究。

粪便是机体代谢的最终产物,也是研究应激反应的重要内容。粪便作为代谢组学研究样本在目前应激文献中很少涉及。但粪便也是宿主与肠道微生物相互作用相互影响所形成的共同代谢产物,acetate 在本研究所获得差异代谢物中浓度水平最高,应激状态下肠道菌群种属和数量的改变如何影响到粪便代谢物 acetate 和 pimelate 变化为课题组下一步需要明确的研究内容。

【参 考 文 献】

[1] 翟亚南,陈柏安,郭 萌,等. 束缚应激的研究进展 [J]. 实验动物科学,2013,30(4):56-61.
 [2] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analy-

sis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 1999,29(11):1181-1189.
 [3] Baharum SN, Azizan KA. Metabolomics in systems biology [J]. Adv Exp Med Biol,2018,1102:51-68.
 [4] Liu X, Zheng X, Du G, et al. Brain metabonomics study of the antidepressant-like effect of Xiaoyaosan on the CUMS-depression rats by ¹H NMR analysis [J]. J Ethnopharmacol,2019,235:141-154.
 [5] Tian JS, Shi BY, Xiang H, et al. ¹H-NMR-based metabolomic studies on the anti-depressant effect of genipin in the chronic unpredictable mild stress rat model [J]. PLoS One,2013,8(9):e75721.
 [6] 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.
 [7] 祖先鹏. 抑郁症患者代谢组与肠道菌群结构特征分析及 Bacopaside I 抗抑郁作用的机制研究 [D]. 上海:中国人民解放军海军军医大学,2018.
 [8] 罗和古,陈家旭,岳广欣,等. 逍遥散调节慢性束缚应激大鼠代谢组学的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志,2008,2(12):1112-1117.
 [9] 田俊生,史碧云,冯光明,等. 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 [J]. 中草药,2013,44(22):3170-3176.
 [10] Wang SX, Chen JX, Yue GX, et al. Xiaoyaosan decoc-

- tion regulates changes in neuropeptide Y and leptin receptor in the rat arcuate nucleus after chronic immobilization stress [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012; 38:1278.
- [11] Pan Q, Wu J, Liu Y, et al. Involvement of hepatic SHIP2 and PI3K/Akt signalling in the regulation of plasma insulin by Xiaoyaosan in chronic immobilization-stressed rats [J]. *Molecules*, 2019, 24(3):E480.
- [12] Wang SX, Chen JX, Yue GX, et al. Neuropeptide Y and leptin receptor expression in the hypothalamus of rats with chronic immobilization stress [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(18):1721-1726.
- [13] 王霞, 王少贤, 方朝义, 等. 慢性束缚应激大鼠下丘脑弓状核食欲调控因子的变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(3):473-478.
- [14] 李晓娟. 肝郁脾虚证-逍遥散(方证)弓状核的全基因组 DNA 甲基化及其调控[D]. 北京:北京中医药大学, 2018.
- [15] 王坤红. 逍遥散对慢性心理应激大鼠行为学及代谢组学的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2017.
- [16] Yang L, Zhao Y, Wang Y, et al. The effects of psychological stress on depression [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2015, 13(4):494-504.
- [17] 张玉荣, 王瑞忠, 陈蕊, 等. 产前应激子代大鼠海马 Wnt/ β -catenin 信号通路的改变诱导抑郁和焦虑样行为[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(2):222-226.
- [18] 谢兴振, 迟晓丽, 周文霞, 等. 应激动物模型研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(16):1375-1380.
- [19] 严灿, 史亚飞, 李艳, 等. 加味逍遥散对慢性心理应激大鼠胸腺糖皮质激素受体作用的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(12):1494-1496.
- [20] Faron-Górecka A, Kuśmider M, Kolasa M, et al. Chronic mild stress alters the somatostatin receptors in the rat brain [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2016, 233(2):255-266.
- [21] Hu C, Luo Y, Wang H, et al. Re-evaluation of the inter-relationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9):e0185129.
- [22] Jin S, Zhao Y, Jiang Y, et al. Anxiety-like behaviour assessments of adolescent rats after repeated maternal separation during early life [J]. *Neuroreport*, 2018, 29(8):643-649.
- [23] 王杰鹏, 旷湘楠, 张城浩, 等. 慢性应激肝郁脾虚模型大鼠行为学变化及逍遥散调节作用[J]. *河北中医药学报*, 2016, 31(4):7-10, 21.
- [24] 王霞, 马金生, 吴佳欣, 等. 逍遥散对慢性束缚应激模型大鼠行为学和下丘脑弓状核 NPY 及受体 Y1 表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(4):453-458.
- [25] Li XJ, Ma QY, Jiang YM, et al. Xiaoyaosan exerts anxiolytic-like effects by down-regulating the TNF- α /JAK2-STAT3 pathway in the rat hippocampus [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):353.
- [26] Li Y, Cheng KC, Liu KF, et al. Telmisartan activates PPAR δ to improve symptoms of unpredictable chronic mild stress-induced depression in mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):14021.
- [27] Lee TH, Kim K, Shin MS, et al. Treadmill exercise alleviates chronic mild stress-induced depression in rats [J]. *J Exerc Rehabil*, 2015, 11(6):303-310.
- [28] Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, et al. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation [J]. *Nutrients*, 2015, 7(4):2839-2849.
- [29] Needell JC, Ir D, Robertson CE, et al. Maternal treatment with short-chain fatty acids modulates the intestinal microbiota and immunity and ameliorates type 1 diabetes in the offspring [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9):e0183786.
- [30] Vinolo MA, Rodrigues HG, Nachbar RT, et al. Regulation of inflammation by short chain fatty acids [J]. *Nutrients*, 2011, 3(10):858-876.
- [31] Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate [J]. *Nature*, 2017, 551(7678):115-118.
- [32] 王亮, 曹云, 李中峰, 等. 慢性萎缩性胃炎脾胃湿热证和脾胃虚寒证患者的血浆代谢组学特征[J]. *中医杂志*, 2019, 60(2):131-136.
- [33] 彭瑛, 樊志坚, 赵燕飞, 等. 丙氨酸在仔猪营养中的功能研究进展[J]. *湖南畜牧兽医*, 2014, 184:2-4.

(责任编辑: 林白霜, 余小慧)