

糖尿病并发抑郁症大鼠肠道菌群失衡初步研究

马文恺, 李薇, 雷诗卉, 杨蕙, 王瑾茜

湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410027

摘要: **目的** 通过对糖尿病并发抑郁症(diabetes-related depression, DD)大鼠肠道微生物进行 16s rRNA 测序分析,探讨该疾病状态下肠道菌群的变化。**方法** 建立 DD 模型,以健康 SD 大鼠作为空白对照组。每周称量体重的同时进行空腹血糖检测;采用强迫游泳和旷场实验检测大鼠行为学;对各组大鼠肠道内容物进行 16s rRNA 测序;以血清为检测对象,对下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA 轴)相关蛋白及细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)含量进行检测。**结果** 与空白组比较,DD 模型组血糖显著升高并表现出明显抑郁样行为和 HPA 轴亢进;16s rRNA 测序结果提示,与空白组比较,DD 模型组肠道菌群 α 多样性(Chao、Simpson、Shannon 指数)无明显差异;但 β 多样性差异明显,即空白组与 DD 模型组的样品间距离较远;肠道菌群组间差异明显,与空白组比较,DD 模型组中厚壁菌门丰度明显降低($P<0.01$),而拟杆菌门则无明显差异;Bugbase 表型预测提示,与空白组比较,DD 模型组中革兰氏阴性菌明显升高,且血清中 LPS 含量升高。**结论** DD 模型组中肠道菌群紊乱,其变化与单独的糖尿病或抑郁症不同;同时肠道菌群的紊乱至 DD 中条件致病菌增加,从而引起 LPS 升高,这可能与 HPA 轴亢进有关。

关键词: 糖尿病并发抑郁症;肠道菌群;16s rRNA;厚壁菌门;拟杆菌门

中图分类号:R587.2 文献标识码:A 文章编号:1006-3110(2023)02-0139-05 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2023.02.003

Preliminary study on the imbalance of gut microbiota in rats with diabetes mellitus complicated by depression

MA Wen-kai, LI Wei, LEI Shi-hui, YANG Hui, WANG Jin-xi

The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410027, China

Corresponding author: LI Wei, E-mail: 776911156@qq.com

Abstract: **Objective** To explore the alteration of gut microbiota in the disease state by 16s rRNA sequencing analysis of intestinal microbial population in rats with diabetes-related depression (DD). **Methods** A DD model was established, and healthy SD rats were used as the blank control group. The rats were weighed weekly, and fasting blood glucose was measured simultaneously. After the model was established, the rats' behavior was examined by forced swimming test and open field test. The intestinal contents of rats in each group were collected, and 16s rRNA sequencing was performed and analyzed. The serum contents of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis-related proteins and lipopolysaccharide (LPS) in rats of each group were detected. **Results** Compared with the blank control group, the DD model group showed significantly higher blood glucose and exhibited significant depression-like behavior and HPA axis hyperactivity. 16s rRNA sequencing results displayed that compared with the blank control group, α diversities (Chao, Simpson and Shannon indexes) of gut microbiota in the DD model group were not significantly different, but β diversity was significantly different, and the distance between samples in the blank control group and the DD model group was far. The gut microbiota differed significantly between groups. The abundance of phylum *Firmicutes* in the DD model group was significantly lower compared with the blank control group ($P<0.01$), while phylum *Bacteroidetes* was not significantly different. Bugbase phenotypic prediction analysis showed significantly higher gram-negative bacteria and higher serum level of LPS in the DD model group compared with the blank control group. **Conclusion** The gut microbiota in the DD model group is disorderly distributed, with changes different from those in diabetes or depression alone. Gut microbiota disturbance leads to an increase in conditionally pathogenic bacteria in DD and thus results in a rise in LPS, which may be related to HPA axis hyperactivity.

Keywords: diabetes mellitus complicated by depression; gut microbiota; 16s rRNA; *Firmicutes*; *Bacteroidetes*

基金项目: 湖南省中药药科研计划项目(D2022099);湖南省自然科学基金(2019JJ50467);湖南省卫健委科研计划课题(C2019091);湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金(ZYFT201505)

作者简介: 马文恺(1987-),女,本科,技师,研究方向:中西医结合。

通信作者: 李薇, E-mail: 776911156@qq.com。

据国际糖尿病联合会 2021 年统计,目前全球约有 5.37 亿糖尿病患者,该数据在 2045 年将增至 7.83 亿。临床研究发现,25% 的糖尿病患者伴有明显的抑郁症状。而抑郁则增加了糖尿病的进一步发展,且并发症风险升高^[1]。前期研究表明,糖尿病与抑郁症互相影响并进一步加重病情,逐渐形成糖尿病并发抑郁症(diabetes-related depression, DD)^[2-3]。因此,在此基础上研究 DD 的发病机制具有十分重要的意义。

目前有关 DD 的生物学机制大部分集中于临床领域,且主要集中在神经内分泌及神经免疫等研究领域。近年研究发现,肠道菌群的紊乱可能是诱发糖尿病的关键因素^[4],但其机制尚不明确。另有研究表明,肠道菌群在脑肠轴中发挥重要作用,肠道菌群紊乱可增加肠道通透性,并通过下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA 轴)、神经免疫等代谢机制影响中枢神经,从而导致抑郁的发生^[5],然而肠道菌群分析在 DD 中则鲜有报道。本研究以 DD 模型组为研究对象,观察此环境下肠道菌群的变化,初步探讨 DD 中肠道菌群失衡的规律,并对其表型进行 Bugbase 预测。

1 材料与方法

1.1 动物 16 只雄性 SD 大鼠(体重 200~220 g),购自湖南斯拉克景达实验动物有限公司(许可证号:SCXK 2009 0004)。所有大鼠都由湖南中医药大学第一附属医院 SPF 动物房饲养,保持 12 h 的光/暗循环、22 ℃、低湿度环境饲养。本实验获得了湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会的批准。

1.2 实验造模及分组 SD 大鼠以高脂饮食(高脂饲料:3%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.2%丙硫氧嘧啶、5%白糖、10%猪油、81.3%基础饲料)喂养 28 d 后,禁食不禁水 7 h,腹腔注射链脲佐菌素(STZ, 60 mg/kg)。72 h 后,测定空腹血糖,从中选取空腹血糖 ≥ 16.00 mmol/L 的 SD 大鼠 8 只,并给予慢性不可预见性温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)。CUMS 是根据本课题组前期研究^[6]建立。CUMS 具体包括:倾笼 45°、12 h 禁食、潮湿垫料(200 ml/笼, 24 h)、4 ℃冰水浴 5 min、2 min 尾夹、噪音 8 h、昼夜颠倒 24 h。每天采用一种刺激,同种刺激不连续出现。DD 模型组在造模过程中死亡 3 只,剩余 5 只。另设正常 SD 大鼠 8 只为空白组。各组大鼠每周称量体重的同时剪尾进行血糖检测。实验结束后进行指标检测。

1.3 旷场实验 旷场实验广泛用于检测抑郁样啮齿动物。实验在 80 cm×80 cm×40 cm 的敞箱内进行,敞

箱底面被划分成 25 个面积相等的方格。将大鼠放入敞箱内适应 1 min 后,观察并记录大鼠 3 min 内水平运动格数(四爪皆进入记为 1 分)、垂直竖立次数(两前爪腾空或攀附箱壁记为 1 分)。水平活动和垂直竖立分数越低,则说明动物抑郁程度越高。

1.4 强迫游泳实验 强迫游泳实验广泛用于检测抑郁样啮齿动物。在高度为 65 cm、直径为 20 cm 的透明圆筒中注入高度为 40 cm 的(23±1)℃清水。将大鼠放入圆筒中适应 1 min 后,观察并记录 3 min 内大鼠静止的时间(以秒为单位)。动物静止的时间越长,则说明抑郁程度越高。

1.5 样本采集与处理 各组大鼠先进行旷场实验,强迫游泳实验。禁食 8 h 后处死,收集各组大鼠直肠内粪便样本,-80 ℃保存备用。

1.6 肠道菌群测序 使用快速 DNA SPIN 提取试剂盒(MP Biomedicals, 美国)提取粪便样本中 DNA。采用 PCR 扩增后,使用 IlluminaMiSeq 测序系统对样本 16sr RNA 的 V3, V4 区域进行测序。在相似性 97%的水平上对序列进行聚类(USEARCH 软件 10.0 版),以所有序列数的 0.005%作为阈值过滤 OTU。

使用 QIIME2 平台进行 α 多样性及 β 多样性分析,其中 β 多样性分析主要是基于 R 语言平台绘制样本主成分分析图、物种多样性矩阵热图(Bray-curtis 算法)和等级树图;LefSe 分析是采用线性判别分析来估算每个组分(物种)丰度对差异效果影响的大小,该分析主要是用于找到组间在丰度上有显著差异的物种。Bugbase 分析对菌群进行表型预测。

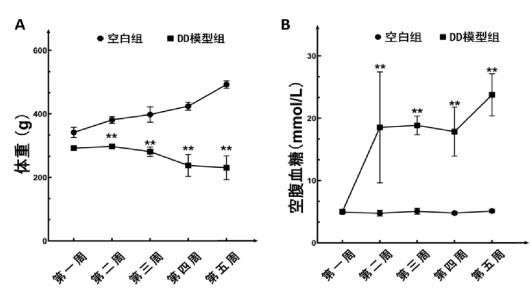
1.7 ELISA 检测 HPA 轴功能相关蛋白 使用酶联免疫吸附试剂盒测定血清中促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)、促肾上腺皮质激素(adreno-cortico-tropic-hormone, ACTH)、皮质醇(cortisol)及细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的表达水平(江苏索菲亚生物科技有限公司)。

1.8 统计学分析 数据分析采用分析软件 Graphpad Prism 9.4,各指标采用双因素方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体重及血糖变化 每周称量各组大鼠体重,与空白组比较,DD 模型组的体重随 CUMS 造模的进程持续降低,差异有统计学意义($t = 5.027/7.059/11.260/15.810$,均 $P < 0.001$)。每周剪尾检测各组大鼠血糖变化,实验结果表明,与空白组比较,DD 模型组随着 CUMS 造模的时间增加,血糖持续升高($t = 6.597/$

6.597/6.261/8.923,均 $P<0.001$),见图1。

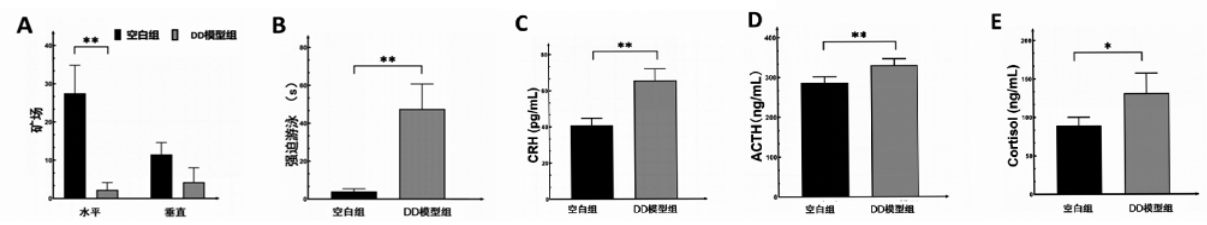


注: * * 表示与空白组比较, $P<0.001$ 。

A 每周体重变化;B 每周空腹血糖变化。

图1 各组大鼠每周体重及空腹血糖变化

2.2 大鼠抑郁样行为及HPA轴改变 在矿场实验中,与空白组比较,DD模型组的爬行格数(水平运动)明显降低,差异有统计学意义($t=7.927, P<0.001$);与空白组比较,DD模型组的站立次数(垂直运动)差异无统计学意义。在强迫游泳实验中,与空白组比较,DD模型组表现出明显抑郁行为,其静止时间显著升高($t=6.047, P=0.009$)。血清中HPA轴功能相关蛋白含量显示,与空白组比较,CRH($t=6.541, P<0.001$)、ACTH($t=3.886, P=0.008$)、Cortisol($t=2.969, P=0.025$)的含量在DD模型组中明显升高,见图2。



注: * 表示与空白组比较 $P<0.05$, * * 表示与空白组比较 $P<0.01$ 。

A. 矿场实验;B. 强迫游泳实验;C. ELISA检测CRH的表达;D. ELISA检测ACTH的表达;E. ELISA检测Cortisol的表达

图2 各组大鼠行为学及HPA轴功能相关蛋白检测结果

2.3 大鼠肠道菌群 α 多样性分析 本研究对空白组、DD模型组大鼠进行肠道菌群16s rRNA测序。 α 多样性分析主要用于评估群落内多样性,其中Chao指数主要用于估算物种总数(图3A);而Shannon指数

(图3B)和Simpson指数(图3C)主要用于估算群落多样性。结果提示,空白组与DD模型组的 α 多样性差异不明显,差异无统计学意义。

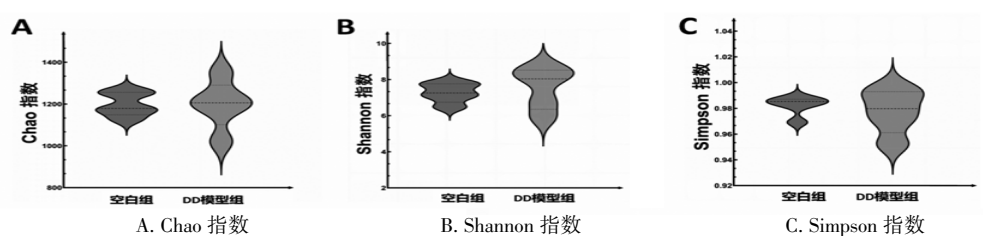


图3 各组大鼠肠道菌群 α 多样性分析

2.4 大鼠肠道菌群 β 多样性分析 通过分析空白组与DD模型组样品特征组成可以反映两组间的差异及距离。主成分分析降维排序分析提示两个样品距离越近,则表示这两个样品的组成越相似;本研究结果显示(图4A),空白组与DD模型组内样本与样本的群落组成距离较远,表明空白组与DD模型组群落组成成分

差异较大,且有统计学意义。基于Bray-curtis算法展示其样本聚类热图,颜色梯度由蓝色到红色表示样品间距离由近到远。本研究中,空白组与DD模型组之间的颜色逐渐变红(图4B)。基于层次聚类分析的等级树图(图4C)提示,空白组与DD模型组都与各自组内样品距离较近。

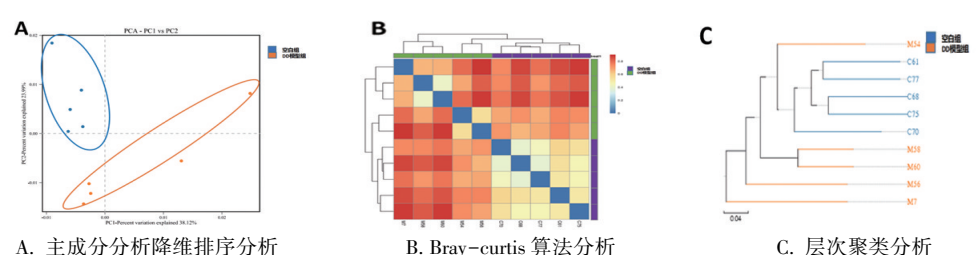
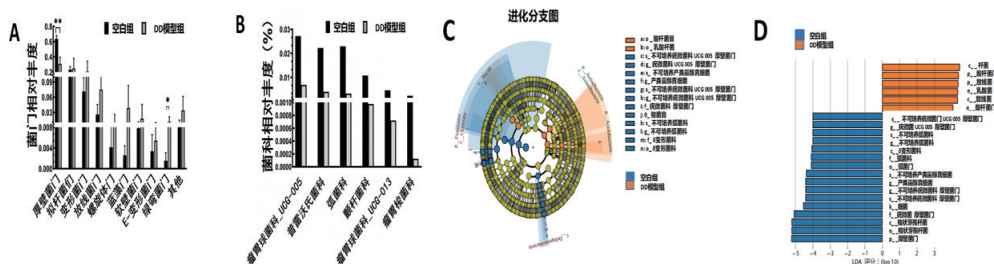


图4 各组大鼠肠道菌群 β 多样性分析

2.5 大鼠肠道菌群中物种分布变化 本研究从肠道菌群的门水平(图 5A)与科水平(图 5B)分析了空白组与 DD 模型组的差异。各组大鼠肠道菌群门水平分析显示(图 5A),SD 大鼠中最常见的门是厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*);其次是变形菌门(*Proteobacteria*)。与空白组相比,DD 模型组厚壁菌门的丰度明显降低,差异有统计学意义($t = 7.417, P < 0.001$)。拟杆菌门的丰度在空白组与 DD 模型组之间差异无统计学意义。与空白组比较,变形菌门的丰度在 DD 模型组中有升高的趋势,但差异无统计学

意义。各组大鼠肠道菌群科水平分析显示(图 5B),与空白组比较,瘤胃球菌科、普雷沃氏菌科、弧菌科、颤杆菌科在 DD 模型组中的均有降低的趋势,但差异无统计学意义。LefSe 分析柱状图显示(图 5D),线性判别分析阈值越大表明该物种差异越明显。LefSe 分析分支图(图 5C)则展示了各组样本群落从门到属主要分类单元的分类等级关系。因此,LefSe 分析提示,空白组的主要标志物种为厚壁菌门,而 DD 模型组的主要标志物种为放线菌门和酸杆菌门。



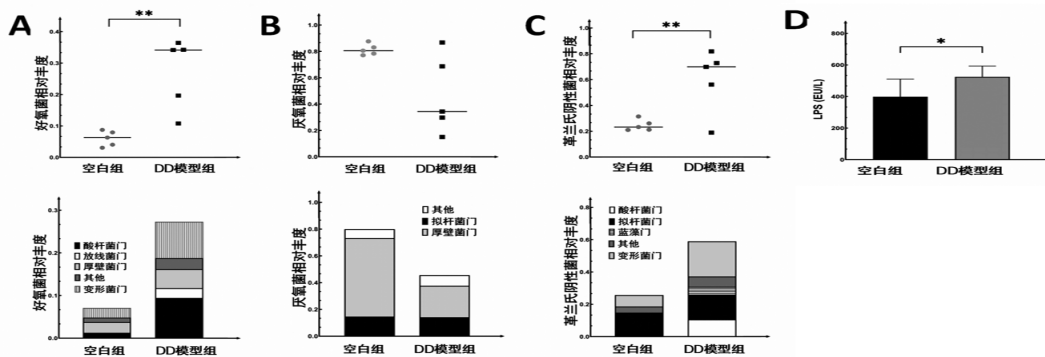
注: * 表示与空白组比较 $P < 0.05$, ** 表示与空白组比较 $P < 0.01$ 。

A. 肠道菌群门水平的差异;B. 肠道菌群科水平的差异;C. 肠道菌群标志物种分析(LefSe 进化分支图);D. 肠道菌群标志物中分析(线性判别分析值分布柱状图,线性判别分析 > 4)。

图 5 各组大鼠肠道菌群物种分布情况

2.6 大鼠肠道菌群 Bugbase 表型预测 本研究通过 Bugbase 表型预测分析各组大鼠的微生物表型。结果显示(图 6A、6C),与空白组比较,DD 模型组中的好氧菌($t = 4.072, P = 0.004$)和革兰氏阴性菌($t = 3.152, P = 0.009$)丰度明显增多,其中变形菌门、酸杆菌门在这两类细菌中占优势;与空白组比较,DD 模型组的厌

氧菌丰度有减少的趋势,且主要是由于厚壁菌门的丰度降低(图 6B)。此外,本研究对各组大鼠血清中 LPS 的含量进行了检测(图 6D),与空白组比较,DD 模型组中 LPS 含量明显升高($t = 2.735, P = 0.014$)。而 LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的一个重要组成部分,这与各组革兰氏阴性菌的丰度改变相符。



注: * 表示与空白组比较 $P < 0.05$, ** 表示与空白组比较 $P < 0.01$ 。

A. 好氧菌表型预测及其菌门分布;B. 厌氧菌表型预测及其菌门分布;C. 革兰氏阴性菌表型预测及其菌门分布;D. ELISA 检测 LPS 的含量。

图 6 各组大鼠肠道菌群 Bugbase 表型测序及 LPS 含量检测

3 讨论

本研究 DD 模型组体重明显下降,血糖显著升高,表现出明显抑郁样行为同时,HPA 轴过度活跃,因此成功建立了 DD 模型^[6]。肠道菌群在现代科学研究中被认为参与了人体生长过程中的炎症及免疫调控机能

的形成。而肠道菌群失衡可损伤中枢神经,从而导致病理性改变^[7]。本研究对 DD 模型组及空白组肠道内容物进行 16s rRNA 测序,结果显示,两组间肠道菌群 α 多样性分析差异无统计学意义,说明 DD 模型组与空白组的肠道菌群物种丰度及物种数量差异不明显;

但 β 多样性分析显示,两组间肠道菌群组成成分差异有统计学意义;LefSe 分析显示,厚壁菌门为空白组肠道菌群的标志性物种,放线菌门和酸杆菌门则为 DD 模型组肠道菌群的标志性物种。

有研究表明,DD 的肠道菌群变化与单独的糖尿病或抑郁症不同。抑郁症患者的肠道微生物多样性减弱,但拟杆菌门和厚壁菌门都相对丰富^[8]。另有研究发现,厚壁菌门与短链脂肪酸活性生产者有关,而短链脂肪酸有助于提高宿主代谢功能^[9]。而拟杆菌门在糖代谢中也发挥着有益的作用^[10]。本研究对空白组与 DD 模型组肠道菌群进行 16s rRNA 测序后发现,厚壁菌门(*Firmicutes*)的丰度与 DD 的病症严重程度呈负相关,而拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的丰度差异无统计学意义。由此发现,一部分研究与本课题结果一致,而另一些则完全与本课题相悖。解释这种矛盾的原因可能如下:第一,肠道菌群的改变被认为受到各种因素的影响,如环境、遗传、饮食等^[11];第二,以往研究大多集中在单独的糖尿病或抑郁症上,而肠道菌群的改变与早期的研究不一致,可能是糖尿病和抑郁症并存的原因。

综上所述,DD 中肠道菌群紊乱,其改变受多种因素影响,且疾病环境下肠道菌群紊乱无规律可循。另有研究表明,肠道菌群紊乱会增加肠道炎症反应^[12],从而导致条件致病菌增加,如革兰氏阴性细菌^[13]。而革兰氏阴性细菌可将 LPS 通过受损的肠道屏障分泌至血液中^[14],并作用于免疫细胞释放促炎性细胞因子,损伤海马神经元,在认知功能、情感、记忆损害的相关疾病中发挥重要作用^[15]。本研究对各组大鼠肠道内容物进行 Bugbase 表型预测后发现,DD 模型组的革兰氏阴性菌明显高于空白组,这与血清中 LPS 含量表达升高具有一致性。同时,异常的 HPA 轴激活与免疫细胞释放促炎细胞因子增加具有相关性^[16]。HPA 轴亢进引起的高皮质醇血症可作用于肠道,增加肠道通透性,刺激肠道神经元,作用于中枢神经,从而引发抑郁样行为^[17]。前期研究发现^[18],HPA 轴亢进是诱发 DD 的关键机制,结合本研究推测,DD 中肠道菌群紊乱、条件致病菌增加至 LPS 含量升高,这可能与 HPA 轴亢进有关,但其相关性有待进一步研究。

参考文献

- [1] Olver TD, Laughlin MH. Endurance, interval sprint, and resistance exercise training: impact on microvascular dysfunction in type 2 diabetes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 310(3): H337-H350.
- [2] de Groot M, Crick KA, Long M, et al. Lifetime duration of depressive

- disorders in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2016, 39(12): 2174-2181.
- [3] 来利娅, 年素娟, 李儿. 杭州市西湖区 2 型糖尿病患者合并抑郁发生情况及影响因素分析[J]. 实用预防医学, 2022, 29(7): 883-886.
- [4] Wang H, Lu Y, Yan Y, et al. Promising treatment for type 2 diabetes: fecal microbiota transplantation reverses insulin resistance and impaired islets[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 9: 455.
- [5] Fan L, Peng Y, Wang J, et al. Total glycosides from stems of *Cistanche tubulosa* alleviate depression-like behaviors: bidirectional interaction of the phytochemicals and gut microbiota[J]. Phytomedicine, 2021, 83: 153471.
- [6] Yang H, Li W, Meng P, et al. Chronic unpredictable mild stress aggravates mood disorder, cognitive impairment, and brain insulin resistance in diabetic rat[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018; 2901863.
- [7] 袁榴翼, 李小锦, 尹清晨, 等. 中药干预肠道菌群改善肠黏膜屏障功能的研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(8): 1932-1938.
- [8] Kim CS, Cha L, Sim M, et al. Probiotic supplementation improves cognitive function and mood with changes in gut microbiota in community-dwelling older adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2021, 76(1): 32-40.
- [9] Zhao L, Zhang F, Ding X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes [J]. Science, 2018, 359(6380): 1151-1156.
- [10] Gurung M, Li Z, You H, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology[J]. EBioMedicine, 2020, 51: 102590.
- [11] Sandhu KV, Sherwin E, Schellekens H, et al. Feeding the microbiota-gut-brain axis: diet, microbiome, and neuropsychiatry[J]. Transl Res, 2017, 179(44): 223-244.
- [12] Luck H, Tsai S, Chung J, et al. Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents[J]. Cell Metab, 2015, 21(4): 527-542.
- [13] 于金凤. 2 型糖尿病的炎症状态与幽门螺旋杆菌感染综述[J]. 医学信息, 2013, 7(1): 581.
- [14] Santisteban MM, Kim S, Pepine CJ, et al. Brain-gut-bone marrow axis: Implications for hypertension and related therapeutics[J]. Circ Res, 2016, 118(8): 1327-1336.
- [15] Yang J, Liu R, Lu F, et al. Fast green FCF attenuates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior and downregulates TLR4/Myd88/NF- κ B signal pathway in the mouse hippocampus[J]. Front Pharmacol, 2019, 10(1): 501-513.
- [16] Harrison BJ, Olver JS, Norman TR, et al. Effects of serotonin and catecholamine depletion on interleukin-6 activation and mood in human volunteers[J]. Hum Psychopharmacol, 2002, 17(6): 293-297.
- [17] Sudo N, Chida Y, Aiba Y, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice: commensal microbiota and stress response[J]. J Physiol, 2004, 558(Pt 1): 263-275.
- [18] 王宇红, 杨蕙, 孟盼, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠行为学及认知功能的影响[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(12): 1427-1431.

收稿日期: 2022-09-27