

马乳酒样乳杆菌 1207 对 CUMS 小鼠焦虑及抑郁样行为的缓解作用

成欣怡, 邵滇, 周玉婷, 梁嘉琦, 侯雅琴, 穆欣宇, 刘翔, 王艳萍, 耿伟涛*

天津科技大学食品科学与工程学院, 天津市食品质量与健康重点实验室, 天津 300457

成欣怡, 邵滇, 周玉婷, 梁嘉琦, 侯雅琴, 穆欣宇, 刘翔, 王艳萍, 耿伟涛. 马乳酒样乳杆菌 1207 对 CUMS 小鼠焦虑及抑郁样行为的缓解作用. 微生物学报, 2022, 62(8): 3109–3123.

Cheng Xinyi, Shao Zhen, Zhou Yuting, Liang Jiaqi, Hou Yaqin, Mu Xinyu, Liu Xiang, Wang Yanping, Geng Weitao. *Lactobacillus kefirifaciens* 1207 alleviates anxiety and depression-like behavior in CUMS mice. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3109–3123.

摘要:【目的】越来越多的研究表明, 益生菌能够通过“微生物-肠-脑”轴来调节中枢神经系统, 影响精神障碍疾病的发生和发展。因此, 精神健康相关的益生菌资源的开发具有重要的意义。本文利用慢性不可预知温和应激小鼠模型(chronic unpredictable mild stress, CUMS), 研究了一株分离自西藏 Kefir 粒的马乳酒样乳杆菌 1207 对小鼠焦虑样和抑郁样行为的缓解作用。【方法】本研究构建了 CUMS 模型, 并利用马乳酒样乳杆菌 1207 (10^9 CFU/d)灌胃进行 2 周的干预。随后, 分别利用旷场实验、悬尾实验和强迫游泳评估了该菌株对小鼠的焦虑样和抑郁样行为的影响; 通过测定下丘脑、血清和脾脏中生物标记物的含量变化, 研究了该菌株对色氨酸代谢、下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴和炎症因子的调节作用。【结果】与对照小鼠相比, 灌胃马乳酒样乳杆菌 1207 可显著增加小鼠在旷场实验中中央区域的滞留时间($P<0.05$); 降低小鼠在悬尾实验($P<0.01$)和强迫游泳实验($P<0.05$)中的不动时间; 可通过降低小鼠下丘脑中 5-羟色胺/5-羟色胺来改善小鼠下丘脑的色氨酸代谢; 通过降低血清中皮质酮(corticosterone, CORT)的水平, 调控 HPA 轴的平衡; 通过增加小鼠脾脏中抗炎细胞因子(inflammatory cytokines-10, IL-10)的相对表达量($P<0.05$), 有效抑制炎症的发生。【结论】本研究表明, 为期 2 周的马乳酒样乳杆菌 1207 灌胃干预可以有效调节“肠脑轴”相关生物标记物, 显著改善小鼠焦虑样和抑郁样行为。本研究有助于为精神疾病的预防和治疗提供新的益生菌干预策略。

基金项目: 国家自然科学基金(31801514); 天津市大学生创新创业训练计划(202110057173)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31801514) and by the Tianjin Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (202110057173)

*Corresponding author. E-mail: gengwt@tust.edu.cn

Received: 6 December 2021; Revised: 29 March 2022

关键词：马乳酒样乳杆菌；肠-脑轴；焦虑样行为；抑郁样行为；生物标记物

Lactobacillus kefiranofaciens 1207 alleviates anxiety and depression-like behavior in CUMS mice

CHENG Xinyi, SHAO Zhen, ZHOU Yuting, LIANG Jiaqi, HOU Yaqin, MU Xinyu, LIU Xiang, WANG Yanping, GENG Weitao*

Key Laboratory of Food Quality and Health of Tianjin, College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: [Objective] Increasing studies have proved that probiotics can regulate the central nervous system through the microbiome-gut-brain axis and affect the occurrence and development of mental disorders. Therefore, the development of probiotics resources related to mental health is of great significance. We employed the mouse model of chronic unpredictable mild stress (CUMS) to study the alleviating effects of *Lactobacillus kefiranofaciens* 1207 isolated from Tibet Kefir grains on the anxiety and depression behavior in mice. [Methods] The CUMS model was constructed and intragastrically administrated with *L. kefiranofaciens* 1207 (10^9 CFU/d) for two weeks. The effects of the strain on the anxiety-like and depression-like behaviors of mice were evaluated by open field test, tail suspension test, and forced swimming test. The regulatory effects of the strain on tryptophan metabolism, hypothalamus-pituitary-adrenal axis, and inflammatory cytokines were evaluated based on the content of biomarkers in hypothalamus, serum, and spleen. [Results] Compared with the control, *L. kefiranofaciens* 1207 prolonged the retention time in the central region in the open field test ($P<0.05$), as well as the stationary time in the tail suspension test ($P<0.01$) and forced swimming test ($P<0.05$). Additionally, it improved the tryptophan metabolism of hypothalamus by reducing 5-hydroxyindoleacetic acid/5-hydroxytryptamine in mice and regulated the balance of hypothalamus-pituitary-adrenal axis by lowering the serum level of corticosterone. By up-regulating the relative expression of anti-inflammatory cytokine (inflammatory cytokines-10, IL-10) in mouse spleen ($P<0.05$), *L. kefiranofaciens* 1207 inhibited the occurrence of inflammation. [Conclusion] Two weeks of oral administration of *L. kefiranofaciens* 1207 can effectively regulate the biomarkers related to the gut-brain axis and alleviate the anxiety and depression-like behavior of mice. Our study provides new probiotic intervention strategies for the prevention and treatment of psychiatric disorders.

Keywords: *Lactobacillus kefiranofaciens*; gut-brain axis; anxiety-like behavior; depression-like behavior; biomarker

随着社会竞争压力愈加激烈，抑郁、狂躁、分裂、失眠等精神类疾病越来越普遍^[1]。精神类疾病不仅为个人和家庭带来巨大的痛苦，也严重地加剧了现代社会的负担。据世界卫生组织报道，预计 2030 年，抑郁症等精神健康疾病

将成为全球疾病负担的首要因素^[2]。其中，焦虑样行为和抑郁样行为是抑郁症等众多精神疾病的共同临床特征^[3]。由于抑郁样行为和焦虑样行为容易通过动物模型模拟，并通过旷场实验等行为学实验进行精确的评估^[4-5]，因此，构

建具有焦虑和抑郁样行为的动物模型,并探索有效的治疗和干预策略,对于抑郁症等精神异常疾病的预防、缓解和治疗具有重要意义。

近年来,越来越多的研究证明“微生物-肠-脑”轴在胃肠道与中枢神经系统双向应答中发挥了重要作用^[6]。Burokas 等^[7]的研究发现,肠道菌群失调与压力和焦虑有关,压力环境可能导致一系列的生理应激反应,改变肠道微生物群的组成。“微生物-肠-脑”轴主要依赖迷走神经途径、免疫途径和神经内分泌途径影响肠脑之间的相互作用^[8]。因而,肠道微生物成为了影响中枢神经的功能发育和疾病发生的重要靶点^[9]。众多研究表明,益生菌干预改善肠道菌群可能为精神障碍疾病的临床辅助治疗提供了新的策略。2013年,来自爱尔兰科克大学的神经药理学专家 John 和精神病学家 Timothy 首次提出了“精神益生菌”的概念^[10],明确了益生菌在调节中枢神经功能方面的作用。另外, Jawelot 等^[11]和 Desbonnet 等^[12]的研究表明,食用益生菌制剂可改善抑郁症小鼠 HPA 轴的过度活动,影响促炎细胞因子和皮质醇等单胺类物质的产生,调控色氨酸合成途径,缓解应激小鼠的异常行为。Janik 等^[13]也应用益生菌 *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1)对 BALB/c 鼠进行干预,发现小鼠大脑区脑谷氨酸、N-乙酰天门冬氨酸和 GABA 水平增加,焦虑、抑郁样行为减轻,再次证实了精神益生菌对大脑活性的调节作用。

因此,开发具有精神健康调节功能的精神益生菌,探索其在缓解压力和焦虑方面的调节作用和潜在机制,在精神类疾病的防治中具有重要意义^[14]。课题组前期通过行为学测试筛选出的马乳酒样乳杆菌在改善焦虑样和抑郁样行为方面表现出优良的性能。2021年,国家卫生健康委员会公布马乳酒样乳杆菌马乳酒样亚种新增为我国新食品原料。随着对马乳酒样乳杆

菌研究的不断深入,发现该菌具有抑制有害菌、调节代谢和免疫、维持肠道健康、抗过敏作用、改善精神抑郁等多种益生功能,尤其是其较强的肠道黏附能力备受关注,这些益生特性与菌株的特异性密切相关。本研究采用慢性不可预知温和刺激小鼠模型,全面地评估了一株耐酸耐胆盐、定殖存活能力强、生长速度快^[15]的马乳酒样乳杆菌 1207 对小鼠焦虑样和抑郁样行为缓解作用。本研究旨在发现并验证可利用的精神健康益生菌促进大脑健康,为我国提供精神健康菌株备选,有助于为马乳酒样乳杆菌在精神健康功能食品中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

改良 MRS 培养基:葡萄糖 2%,酵母浸粉 4.5%,磷酸氢二钾 0.05%,硫酸锰 0.02%,氯化钠 0.015%,半胱氨酸盐酸盐 0.14%,乙酸钠 1.5%,吐温-80 0.1%。

氟西汀试剂(抗抑郁药物)购自上海迈瑞尔化学技术有限公司。

检测试剂盒:肾上腺酮(CORT)试剂盒、小鼠促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)试剂盒、小鼠 5 羟色胺(5-HT)试剂盒、小鼠 5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)试剂盒、小鼠色氨酸(TRP)试剂盒,购自南京草本源生物科技有限公司;小鼠 IL-10 ELISA 试剂盒、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒、小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒,购自杭州联科生物技术股份有限公司。

1.2 仪器和设备

电子分析天平 JA2003 购自上海精科天平厂;超净工作台 HF safe 900 购自上海力申科学仪器有限公司;制冰机 SZM F124 购自 SANYO 公司;台式高速冷冻离心机 3-18K 购自 SIGMA 公司;自动灭菌锅 SM510 购自 Yamato 公司;

厌氧培养箱及气罐 WMZK-02 购自浙江冷冻机总厂；扫描电子显微镜 SU1510 购自日立技术公司。

1.3 试验菌种与动物

1.3.1 试验菌株及培养基

本试验所用马乳酒样乳杆菌 1207 (分离自西藏 Kefir 粒^[16])于天津科技大学益生菌资源保藏中心-80 °C保藏。马乳酒样乳杆菌 1207 充分活化后,接种于改良 MRS 液体培养基中,37 °C 厌氧培养 48 h,备用。

1.3.2 试验动物

选用 5 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠(SPF 级,北京斯贝福实验动物有限公司),饲养于天津科技大学屏障系统动物房中。所有动物试验均由天津科技大学学术委员会批准(批准号:TUST20210625),依照《天津科技大学动物管理与使用指南》进行。

1.4 菌株活化和灌胃菌剂制备

菌种使用前,以无菌接种环挑取适量保藏菌液,在改良 MRS 琼脂平板上划线,37 °C 厌氧培养 48 h 进行活化。挑取单菌落,接种于液体培养基中,37 °C 厌氧培养 48 h 作为种子液;种子液以 4%的接种量,接种于 100 mL 改良 MRS 液体培养基中,37 °C 厌氧培养 48 h 后进行离心收集菌体。4 °C、6 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清液,将菌体重悬于 0.85%的无菌生理盐水中,制成活菌浓度为 10⁹CFU/mL 的灌胃菌剂。

1.5 动物实验设计

将 32 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠在适应环境一周之后随机分为 4 组,每组 8 只,分别为空白对照组、CUMS 模型组、益生菌干预组、氟西汀对照组。氟西汀是市场上现有的抗抑郁药物之一,它是一种 5-羟色胺再摄取抑制剂,是目前使用比例最多的抗抑郁药物,通过抑制 5-羟色胺再摄取,影响 5-羟色胺神经递质的功能,进而影响人的情绪。本研究灌胃氟西汀作为阳性对照组进行实验,与其他组别进行比较。对照组一笼 8 只进行实验,除空白对照组外,其他均单笼饲养(致社交缺陷、沟通障碍,增加分离焦虑^[17-18]),给予对照组、模型组小鼠每天灌胃 0.85%无菌生理盐水,益生菌组每天灌胃马乳酒样乳杆菌 1207 (10⁹ CFU/d),氟西汀组每天灌胃氟西汀[2.5 mg/(kg·d)],实验分组及处理方法见表 1。从第二周开始,除空白组外,所有小鼠施加为期 9 周的慢性不可预知温和刺激。第八周开始对所有小鼠进行持续二周的灌胃。在第七周末和第九周末进行行为学实验,包括旷场实验、强迫游泳实验、悬尾实验和糖水偏好实验。

1.6 慢性不可预知温和刺激小鼠模型的构建

慢性不可预知温和刺激模拟了人类受到日常生活中的不可预知压力,常应用于抑郁模型造模^[19-21]。本研究所采用的慢性不可预知温和刺激包括:(1)禁水 24 h,(2)倾斜鼠笼 45°

表 1 动物实验分组及处理方法

Table 1 Grouping and treatment of animal experiment

Group treatment	Method	Intragastric cycle	Experimental cycle	Quantity
Control	Intragastric administration of 0.85% sterile normal saline	2 weeks	9 weeks	8
CUMS	Intragastric administration of 0.85% sterile normal saline	2 weeks	9 weeks	8
1207	Intragastric administration of 10 ⁹ CFU/d probiotics	2 weeks	9 weeks	8
FLU	Intragastric administration of 2.5 mg/(kg·d) Fluoxetine	2 weeks	9 weeks	8

12 h, (3) 摇晃鼠笼 10 min, (4) 夹尾 1 min, (5) 禁食 24 h, (6) 浸湿垫料 24 h, (7) 照明 24 h, (8) 束缚 12 h, (9) 冰水游泳 15 min。每天随机给予 1 种刺激, 连续 2 d 不给予相同刺激, 持续 6 周。模型构建是否成功利用行为学实验进行评估。

1.7 行为学实验

行为学实验评估方法参考 Liu 等、Cryan 等的描述^[7,22-24]。

旷场实验中, 将动物放入旷场中心后, 立刻开始计时和录像, 观测 6 min 后停止录像。更换动物时, 为避免影响下次测试结果, 须先清洗旷场内壁及底面, 以清除上次动物余留的信息(如大小便、气味等)。记录 6 min 内小鼠直立次数、跨格次数。使用 Etho Vision 软件对视频进行数字化分析, 计算小鼠在旷场中心区域停留的时间百分比: (旷场中心区域停留时间/总监测时间)×100%。

强迫游泳实验中, 透明水杯内装有大约 15 cm 高的清水, 水温为室温。在正式实验前 24 h, 每只小鼠均进行 10 min 的适应性游泳训练。正式实验时, 每只小鼠进行 6 min 游泳测试。使用 Etho Vision 软件对视频进行数字化分析, 计算小鼠 2-6 min 累积的不动时间(判定标准为四肢不动或仅后肢轻微运动)。

悬尾实验中, 将小鼠尾部末端 1 cm 处固定在一个高 55 cm、宽 60 cm 的长方体盒上方悬空, 让其上下左右都难以接触盒壁, 并使其头部朝下时离底部有 20-5 cm。录像记录 6 min, 使用 Etho Vision 软件分析悬尾后第 2-6 min 的累计不动的时间(判定标准为动物放弃主动挣扎, 处于完全不动的状态)。

1.8 血液及下丘脑等组织标本处理^[25]

CUMS 小鼠模型最后一次行为学测试后禁食 24 h 处死, 摘眼球取血, 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min 后取上清, 将收集的血清用液氮冷冻之后存储在-80 °C直至使用。断头取脑, 随

即迅速于冰面上分离出下丘脑, 同其他组织共同置于液氮冷冻之后存储在-80 °C直至分析^[1]。

1.9 神经内分泌系统标志代谢物的测定

使用酶联免疫分析 ELISA 试剂盒对下丘脑中五羟色胺(5-HT)、五羟基吲哚乙酸(5-HIAA)以及色氨酸(TRP, 五羟色胺的前体)进行测定。

使用酶联免疫分析 ELISA 试剂盒比较下丘脑-垂体-肾上腺轴相关生物标记物的变化[血液中皮质酮(CORT)、下丘脑中促肾上腺激素释放激素(CRH)]。

使用酶联免疫分析 ELISA 试剂盒比较 CUMS 模型小鼠脾脏中促炎细胞因子(IL-6)、抗炎细胞因子(IL-10)、 γ 干扰素(IFN- γ)的相对表达量。

数据计算: 将测得的吸光度值代入标准曲线回归方程计算样品中各指标的浓度。

1.10 数据统计分析

实验数据用平均值±95%置信区间表示, 采用 one-way ANOVA 比较差异。统计分析及作图采用 GraphPad Prism 软件和 Etho Vision 软件完成。显著性标准设为 $P < 0.05$; 多重检验 P 值均根据 95%置信区间进行校正。

2 结果与讨论

2.1 马乳酒样乳杆菌 1207 对小鼠的体质量和脏器质量影响

实验开始后, 每周测定小鼠的体质量; 在行为学实验结束后, 对小鼠进行解剖, 测定各脏器的质量; 计算脏器指数, 并比较各组小鼠体质量和脏器指数的差异。结果如图 1 和表 2 所示。

在试验期间, 所有小鼠均健康良好, 皮毛光泽干净, 饮食正常。除空白对照组外, 各组小鼠平均体质量在组间无显著性差异($P > 0.05$) (图 1); 除药物(FLU)组外, 各脏器质量在组间均无显著性差异($P > 0.05$) (表 2)。结果表明马乳酒样乳杆菌 1207 对小鼠没有副作用。

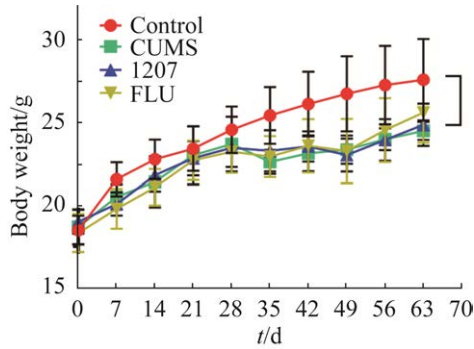


图 1 菌株 1207 对小鼠体质量的影响

Figure 1 Effects of strain 1207 on body weight of mice. * represents the significant difference in comparison between blank (control) group and model (CUMS) group. $P < 0.05$.

2.2 马乳酒样乳杆菌 1207 对小鼠糖水偏好率的影响

在建模七周末、九周末(灌胃益生菌第 2 周)

表 2 菌株 1207 对各脏器质量的影响

Table 2 Effects of strain 1207 on the quality of organs

The experimental group	Organ index				
	Heart	Liver	Spleen	Kidney	Testis
Control	5.58±0.04	46.87±0.09	2.53±0.30	12.56±0.17	6.48±0.03
CUMS	5.26±0.17	45.01±0.04	2.18±0.20	12.73±0.04	7.11±0.06
1207	5.81±0.04	46.15±0.08	2.32±0.13	13.59±0.02	7.35±0.09
FLU	6.35±0.04	46.51±0.05	2.02±0.05	13.23±0.04	6.58±0.03

Organ index=organ mass/body weight $\times 1000$.

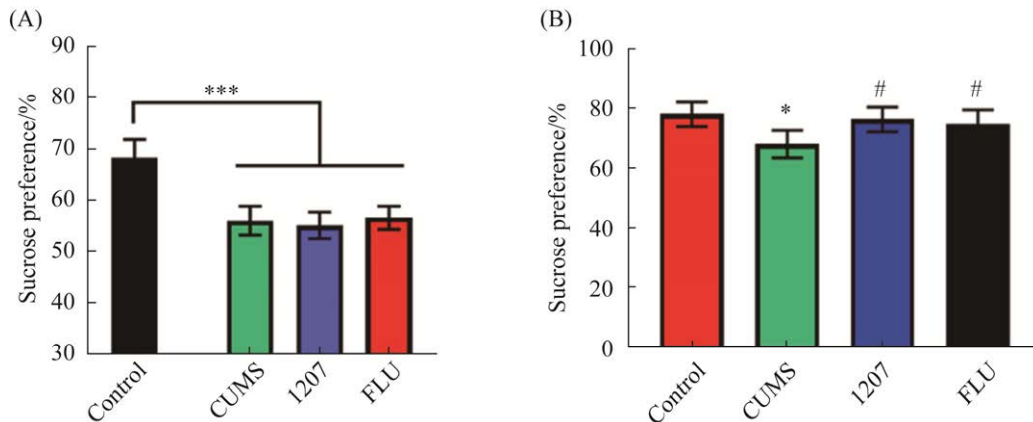


图 2 七周末(A)和九周末(B)各组小鼠糖水偏好率

Figure 2 Preference rate of sugar water of mice in each group at the end of the seventh week (A) and the ninth week (B). * and # indicate significant difference, $P < 0.05$; ** and ## indicate significant difference, $P < 0.01$; *** and ### indicate very significant difference, $P < 0.001$. *, ** and *** represent the comparison between blank (Control) group and model (CUMS) group; #, ## and ### represent the comparison between 1207 and FLU group and model group (CUMS).

时对 Control 组、CUMS 组、灌胃益生菌组和阳性对照各组进行糖水偏好率的测定。将小鼠单笼放置进行 12 h 断食断水,给予小鼠等量的 2% (W/V) 蔗糖水(200 mL/瓶)和纯净水(200 mL/瓶) 24 h 后计算蔗糖偏好指数。本模型能够模拟人类抑郁症快感缺乏的重要特征,所以采用糖水试验来评估小鼠的快感。

如图 2 可知,建模七周末时,CUMS 组、1207 组和 FLU 组糖水偏好率与 Control 组相比显著下降($P < 0.001$);在建模九周末(灌胃益生菌第 2 周)时,CUMS 组的糖水偏好率(%)显著低于 Control 组($P < 0.01$);CUMS 模型小鼠灌胃益生菌 1207 和氟西汀(2.5 mg/kg)后显著恢复由建模造成的快感缺乏。

2.3 马乳酒样乳杆菌 1207 对小鼠旷场实验的影响

本研究中, 利用旷场实验评价了各组小鼠在陌生环境中的焦虑样行为。结果如图 3-4 所示。

建模七周末时, 如图 3A-B 所示, 与 Control 组相比, CUMS 组小鼠的行动轨迹复杂程度更低, 中心区域时间显著减少($P<0.05$); 如图 3C-D 所示, 与 Control 组相比, CUMS 组小鼠直立次数与跨格次数显著降低($P<0.05$), 说明 CUMS 组表现出明显的抑郁样行为。灌胃益生菌 2 周后, 如图 4A-B 所示, 与 CUMS 组相比, 1207 组小鼠的行动轨迹复杂程度更高, 处于中央区域的时间

间显著升高($P<0.05$); 如图 4C-D 所示, 与 CUMS 组相比, 1207 组小鼠的直立次数显著升高($P<0.001$), 且次数高于 FLU 组, 1207 组小鼠的跨格次数也有所升高。旷场实验是一种评估动物在新异环境中自主行为、探究行为与紧张度的方法^[1], 小鼠处于中心区域的时间、直立次数、跨格次数以及其行动轨迹可以反映出小鼠对新环境的自主性与探索性^[26]。与实验室前期筛选出的抗抑郁菌株作用结果相同, 表现出了心理健康菌株的特异性^[15]。综合可知, 为期 2 周的马乳酒样乳杆菌 1207 灌胃显著可以提高模型小鼠的自主活动和探索能力, 减轻其焦虑样行为。

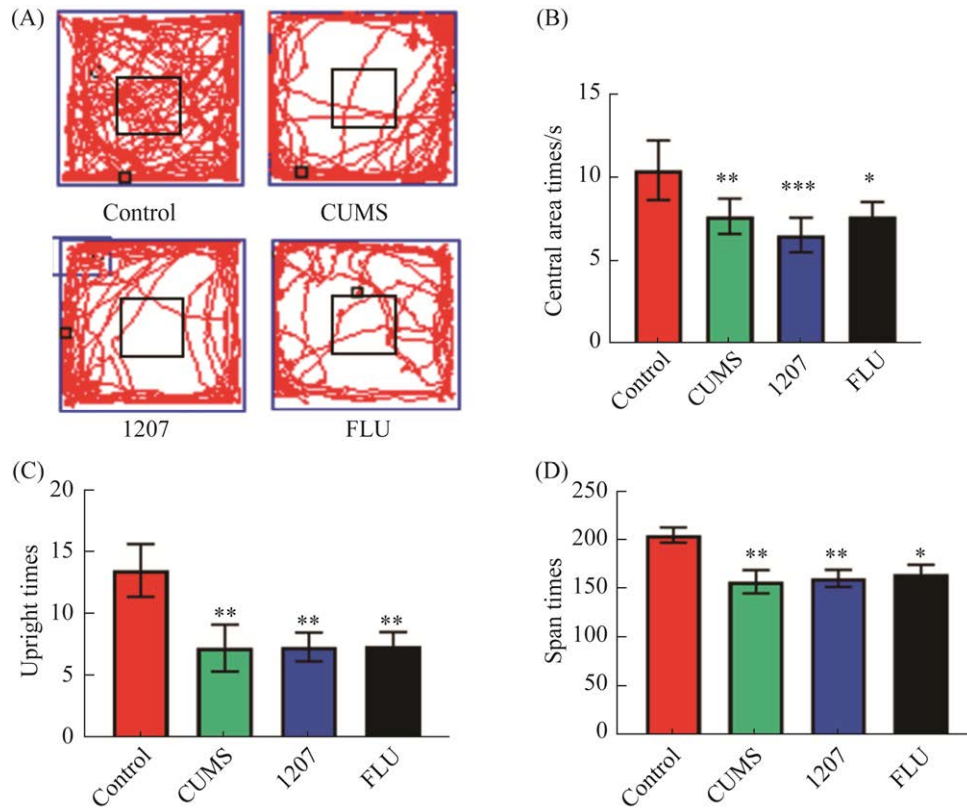


图 3 七周末各组小鼠旷场中的行动轨迹、处于中央区的时间、直立次数和跨格次数

Figure 3 At the end of the seventh week, in the open field, the movement track, the time in the central region, the upright times and the translatable times of mice in each group. A: movement path of mice; B: residence times in central region of mice; C: times of mice standing upright; D: times of mice straddling. * indicate significant difference, $P<0.05$; ** indicate significant difference, $P<0.01$; *** indicate very significant difference, $P<0.001$. *, ** and *** represent the comparison between blank (Control) group and model (CUMS) group.

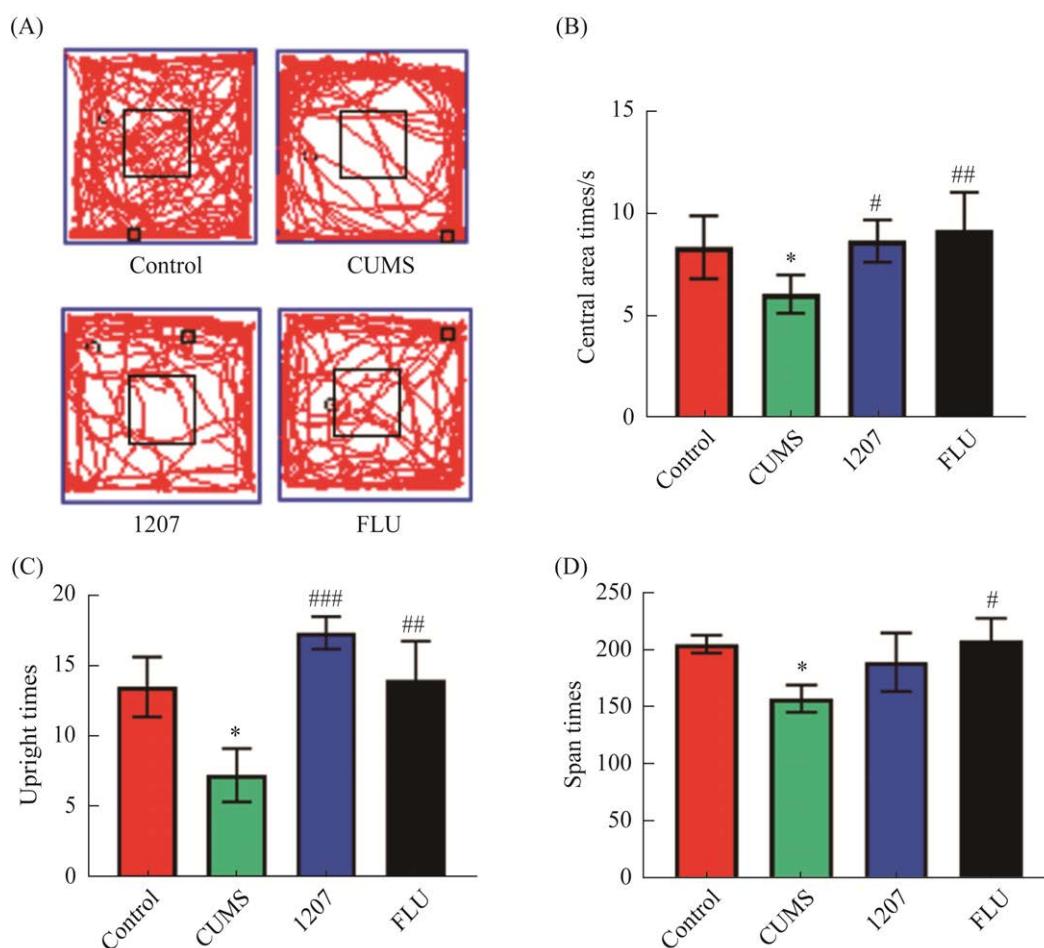


图 4 九周末各组小鼠旷场中的行动轨迹、处于中央区的时间、直立次数和跨格次数

Figure 4 At the end of the ninth week, in the open field, the movement track, the times in the central region, the upright times and the translatable times of mice in each group. A: movement path of mice; B: residence time in central region of mice; C: times of mice standing upright; D: times of mice straddling. * and # indicate significant difference, $P < 0.05$; ** and ## indicate significant difference, $P < 0.01$; *** and ### indicate very significant difference, $P < 0.001$. *, ** and *** represent the comparison between blank (Control) group and model (CUMS) group; #, ## and ### represent the comparison between 1207 and FLU group and model group (CUMS).

2.4 马乳酒样乳杆菌 1207 对小鼠抑郁样行为的影响

本研究中，利用强迫游泳实验和悬尾实验评估了不同组别小鼠的抑郁样行为。强迫游泳实验是一种经典的抑郁模型实验，通过小鼠在水面漂浮的不动时间来测定小鼠的抑郁样行为^[1]。结果如图 5-6 所示。

由图 5A-B 可知，在建模七周末时，与

Control 组相比，CUMS 组小鼠的不动时间显著增加 ($P < 0.05$)，这表明 CUMS 组表现出明显的抑郁样行为。由图 6A 可知，在灌胃益生菌 2 周后，1207 组小鼠在强迫游泳实验中的不动时间与 CUMS 组相比显著降低 ($P < 0.05$)，低于 Control 组和 FLU 组。悬尾实验是一种绝望模型，以小鼠在悬尾实验中放弃挣扎，停止不动的时间长短为指标反映其绝望状态^[27]。由图 6B

可知, 相比 CUMS 组, 1207 组小鼠在悬尾实验中不动时间显著下降 ($P < 0.01$), 实验结果与 Control 组及 FLU 组无明显差异。与孙也等^[15]筛选出的抗抑郁菌株植物乳杆菌 MA2 等 3 株益

生菌作用效果相似, 1207 明显具有更佳的对抑郁样行为改善的功能。上述结果表明, 马乳酒样乳杆菌 1207 的干预可以有效减轻小鼠抑郁样行为, 并且作用效果优于药物 FLU 干预。

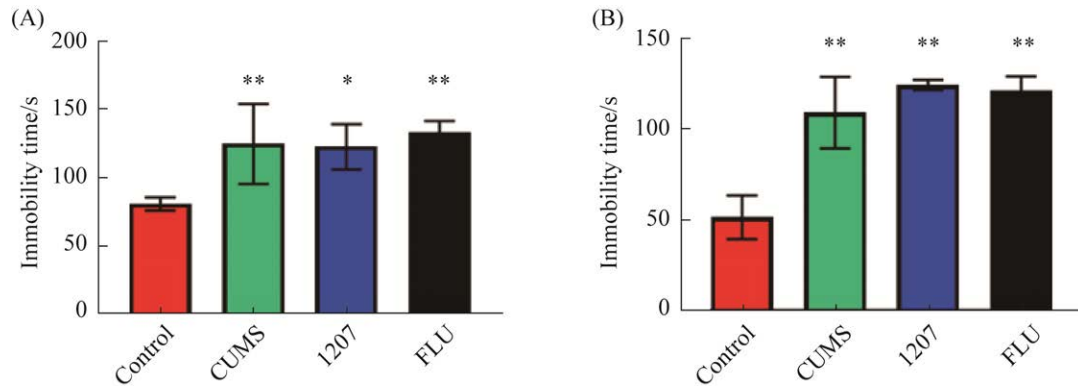


图 5 七周末各组小鼠在强迫游泳与悬尾实验中的不动时间

Figure 5 At the end of the seventh week, the immobility time of mice in forced swimming and tail suspension tests. A: the immobility time of mice in the forced swimming experiment; B: the immobility time of mice in the suspended tail experiment. * indicate significant difference, $P < 0.05$; ** indicate significant difference, $P < 0.01$; *** indicate very significant difference, $P < 0.001$. *, ** and *** represent the comparison between blank (Control) group and model (CUMS) group.

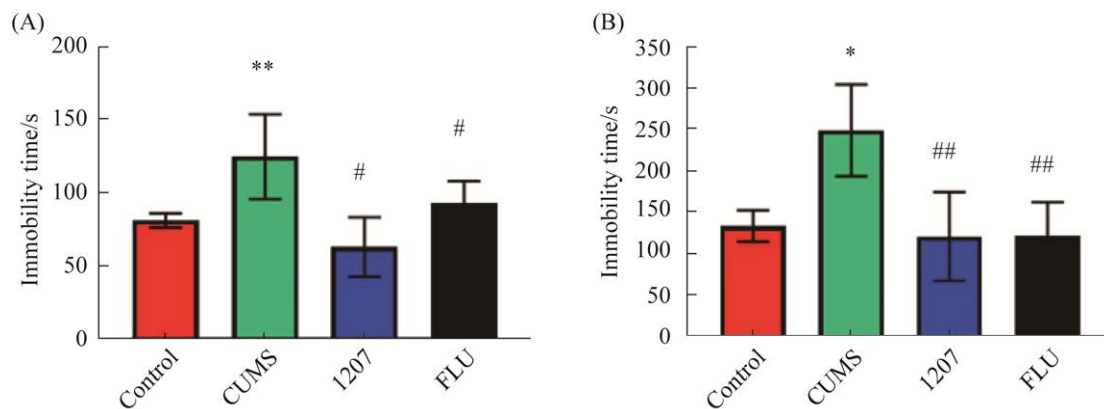


图 6 九周末各组小鼠在强迫游泳与悬尾实验中的不动时间

Figure 6 At the end of the ninth week, the immobility time of mice in forced swimming and tail suspension tests. A: the immobility time of mice in the forced swimming experiment; B: the immobility time of mice in the suspended tail experiment. * and # indicate significant difference, $P < 0.05$; ** and ## indicate significant difference, $P < 0.01$; *** and ### indicate very significant difference, $P < 0.001$. *, ** and *** represent the comparison between blank (Control) group and model (CUMS) group; #, ## and ### represent the comparison between 1207 and FLU group and model group (CUMS).

2.5 马乳酒样乳杆菌 1207 对小鼠色氨酸代谢的影响

采用 ELISA 方法测定下丘脑中色氨酸代谢途径相关生物标记物, 评估马乳酒样乳杆菌 1207 对小鼠体内色氨酸代谢途径的改善作用。结果如图 7-8 所示。

在建模七周末及菌株干预 2 周后(九周末), 各组小鼠的下丘脑中 5-HT、5-HIAA 和 TRP 的变化水平如图 7A-C、图 8A-C 所示。七周末时, 与 Control 组相比, CUMS 组小鼠下丘脑中 5-HT 浓度显著降低(图 7A); 菌株干预 2 周后, 与 CUMS 组小鼠相比, 1207 组小鼠下丘脑中 5-HT 浓度显著升高了约 30% ($P < 0.05$), 基本与 Control 组的浓度相当(图 8A)。5-HT 作为一种神经递质, 能引导大脑产生愉悦情绪, 中枢神经系统中 5-HT 含量的减少直接与精神及情绪变化相关, 进而诱发抑郁症的发生。在色氨酸代谢途径中, 5-HIAA 是 5-HT 分解代谢的产物, TRP 是 5-HT 的前体^[28]。因此, 5-HIAA/5-HT 与 5-HT/TRP 的值, 表明了个体体内色氨酸代谢中 5-HT 的积累程度。5-HIAA/5-HT 的值如图 7B、图 8B 所示,

七周末时, 与 Control 组相比, CUMS 组小鼠下丘脑中 5-HIAA/5-HT 的值显著升高; 与 CUMS 组小鼠相比, 补充菌株 1207 2 周后, 小鼠下丘脑中 5-HIAA/5-HT 的值显著下降了约 40% ($P < 0.05$), 基本恢复至正常组的水平。5-HT/TRP 的值如图 7C、图 8C 所示, 七周末时, 与 Control 组相比, CUMS 组小鼠下丘脑中 5-HT 与色氨酸 (TRP) 的比值显著降低; 补充菌株 1207 两周后, 小鼠下丘脑中 5-HT 与色氨酸 (TRP) 的比值与 Control 组、FLU 组相比有所升高。以上结果表明, 菌株 1207 可以促使下丘脑中 5-HT 的合成, 减少 5-HT 的分解, 恢复下丘脑中 5-HT 的水平。因此, 马乳酒样乳杆菌亚种作为新食品原料, 在调节神经方面具有良好的应用价值。

2.6 马乳酒样乳杆菌 1207 对小鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响

采用 ELISA 方法检测了菌株 1207 对 HPA 轴的作用效果, 结果如图 9-10 所示。

由图 9A-B 可知, 在建模七周末时, 与 Control 组相比, CUMS 组小鼠血清中的皮质酮含量及肾上腺分泌皮质酮的含量均显著升高 ($P < 0.05$);

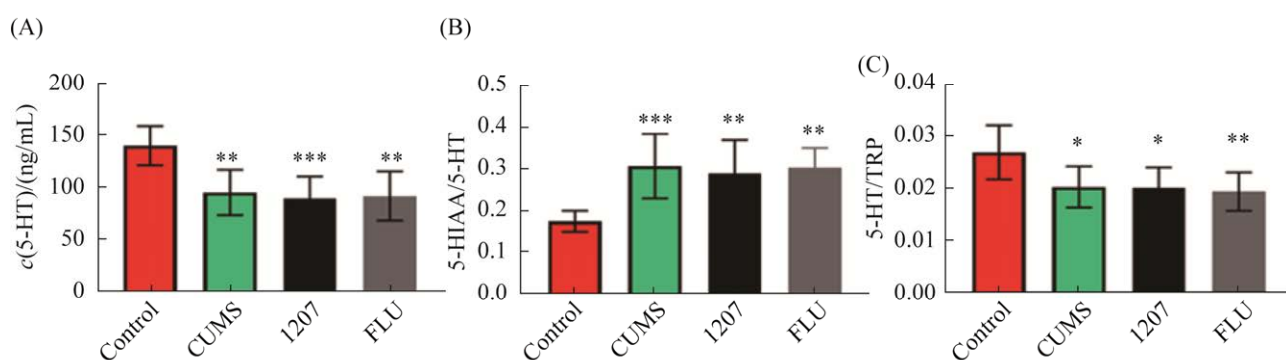


图 7 七周末菌株 1207 对小鼠下丘脑中色氨酸代谢的作用

Figure 7 At the end of the seventh week, effects of strain 1207 on tryptophan metabolism in mouse hypothalamus. A: 5-HT concentration; B: 5-HIAA to 5-HT ratio; C: 5-HT to tryptophan ratio. * indicate significant difference, $P < 0.05$; ** indicate significant difference, $P < 0.01$; *** indicate very significant difference, $P < 0.001$. *, ** and *** represent the comparison between blank (Control) group and model (CUMS) group.

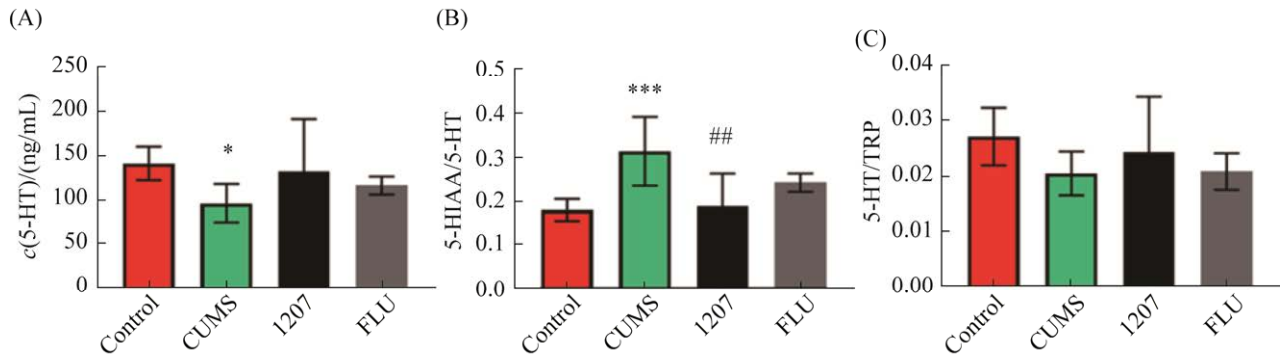


图 8 九周末菌株 1207 对小鼠下丘脑中色氨酸代谢的作用

Figure 8 At the end of the ninth week, effects of strain 1207 on tryptophan metabolism in mouse hypothalamus. A: 5-HT concentration; B: 5-HIAA to 5-HT ratio; C: 5-HT to tryptophan ratio. * and # indicate significant difference, $P < 0.05$; ** and ## indicate significant difference; $P < 0.01$; *** and ### indicate very significant difference, $P < 0.001$. *, ** and *** represent the comparison between blank (Control) group and model (CUMS) group; #, ## and ### represent the comparison between 1207 and FLU group and model group (CUMS).

由图 10A–B 可知，在菌株 1207 灌胃干预 2 周后，与 CUMS 组相比，1207 组小鼠血清中的皮质酮含量显著下降($P < 0.05$), 恢复到了正常 HPA 轴皮质酮浓度水平，而肾上腺分泌皮质酮的含量没有显著变化。这表明菌株 1207 可以调节被过度激活的 HPA 轴中皮质酮的含量，进而恢复 HPA 轴的正常功能。马乳酒样乳杆菌 1207 通过调节细胞骨架和紧密连接蛋白来增强肠屏障功

能，影响粘膜细胞间的相互作用^[16]，通过神经内分泌途径对皮质酮含量进行调节。近几年大量研究资料证实了内分泌系统与精神类疾病有关，临床发现大部分抑郁症患者体内的 HPA 轴处于过激状态。研究表明，益生菌可以通过影响肠道屏障功能和肠道菌群的结构影响机体的内分泌系统，进而通过对 HPA 轴的影响来调节行为^[22,29–30]。

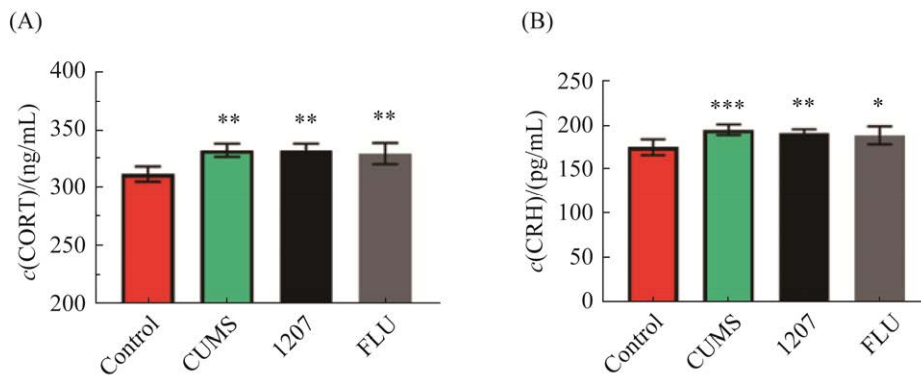


图 9 七周末菌株 1207 对小鼠 HPA 轴的作用

Figure 9 At the end of the seventh week, effects of strain 1207 on HPA axis in mice. A: serum concentration of corticosterone secreted by the adrenal glands; B: serum concentration of corticosterone. * indicate significant difference, $P < 0.05$; ** indicate significant difference, $P < 0.01$; *** indicate very significant difference, $P < 0.001$. *, ** and *** represent the comparison between blank (Control) group and model (CUMS) group.

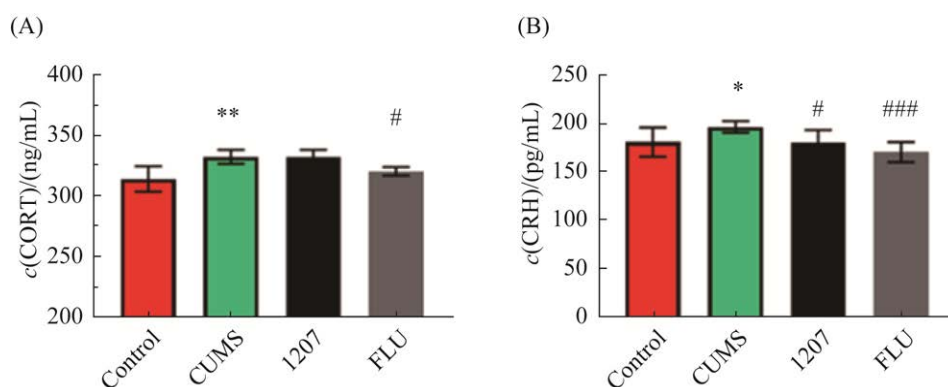


图 10 九周末菌株 1207 对小鼠 HPA 轴的作用

Figure 10 At the end of the ninth week, effects of strain 1207 on HPA axis in mice. A: serum concentration of corticosterone secreted by the adrenal glands; B: serum concentration of corticosterone. * and # indicate significant difference, $P < 0.05$; ** and ## indicate significant difference, $P < 0.01$; *** and ### indicate very significant difference, $P < 0.001$. *, ** and *** represent the comparison between blank (Control) group and model (CUMS) group; #, ## and ### represent the comparison between 1207 and FLU group and model group (CUMS).

2.7 马乳酒样乳杆菌 1207 对小鼠促/抗炎性等细胞因子的影响

采用 ELISA 方法检测了相关细胞因子, 评估菌株 1207 对炎症的作用, 结果如图 11–12 所示。

由图 11 可知, 在建模七周末时, 与 Control 组相比, CUMS 组小鼠血清中, 促炎因子 IL-6

和 IFN- γ 的含量(图 11A、11C)显著升高 ($P < 0.05$), 抗炎因子 IL-10 的含量(图 11B)显著降低 ($P < 0.05$)。图 12 表明, 经过益生菌 1207 灌胃 2 周的小鼠血清中, 促炎因子 IL-6 和 IFN- γ 的含量(图 12A、12C)相较于 CUMS 组显著下降 ($P < 0.05$), 抗炎因子 IL-10 的含量(图 12B)显著高于 CUMS 组 ($P < 0.05$), 与 FLU 组药物的

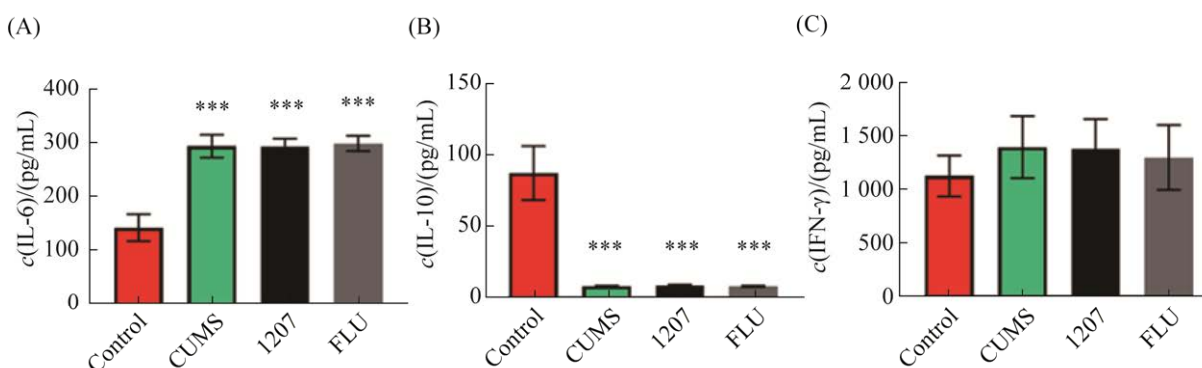


图 11 七周末菌株 1207 对小鼠血清中细胞因子的影响

Figure 11 At the end of the seventh week, effects of strain 1207 on HPA axis in mice. A: IL-6 concentration in the spleen; B: IL-10 concentration in the spleen; C: IFN- γ concentration in the spleen. * indicate significant difference, $P < 0.05$; ** indicate significant difference, $P < 0.01$; *** indicate very significant difference, $P < 0.001$. *, ** and *** represent the comparison between blank (Control) group and model (CUMS) group.

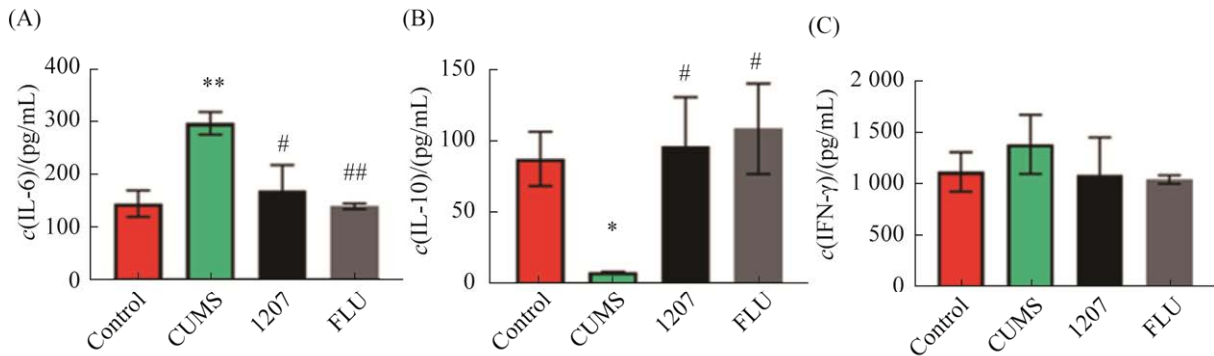


图 12 九周末菌株 1207 对小鼠血清中细胞因子的影响

Figure 12 At the end of the ninth week, effects of strain 1207 on HPA axis in mice. A: IL-6 concentration in the spleen; B: IL-10 concentration in the spleen; C: IFN- γ concentration in the spleen. * and # indicate significant difference, $P < 0.05$; ** and ## indicate significant difference, $P < 0.01$; *** and ### indicate very significant difference, $P < 0.001$. *, ** and *** represent the comparison between blank (Control) group and model (CUMS) group; #, ## and ### represent the comparison between 1207 and FLU group and model group (CUMS).

作用效果趋势相同。这些结果表明, 菌株 1207 能够显著提高抗炎因子水平, 显著降低促炎因子水平, 起到平衡细胞炎症因子的作用。目前, 炎症因子已经成为精神障碍疾病的重要生物标记物。临床研究发现, 抑郁症患者血液中促炎性因子 IL-6 的浓度显著高于正常对照组^[31], 抗炎因子 IL-10 的水平显著低于正常对照组^[32]。马乳酒样乳杆菌具有良好的乳化能力, 可以成功黏附于肠道中通过其代谢产物产生巨大作用。研究表明, 马乳酒样乳杆菌特有的胞外多糖可以通过抑制 Akt 和 ERKs 途径发挥抗炎作用^[16]。也有其他研究表明, 益生菌可以协调促/抗炎性细胞因子, 从而缓解轻度抑郁焦虑样状态^[33]。

3 结论

本研究以“微生物-肠-脑”轴模型为理论基础, 通过建立慢性不可预见性应激小鼠模型, 采用经典的行为学检测方法(悬尾实验、旷场实验、强迫游泳实验)来评估马乳酒样乳杆菌 1207

对小鼠轻度抑郁/焦虑样小鼠的行为作用。本研究的结果表明益生菌 1207 具有改善抑郁/焦虑样行为的潜力。对小鼠体内生物标记物的检测表明, 菌株 1207 可通过调节色氨酸代谢途径、恢复过度激活的 HPA 轴和平衡炎症细胞因子抑制炎症的发生, 发挥改善焦虑样和抑郁样行为的作用。因此, 本研究进一步开拓了对新食品资源马乳酒样乳杆菌亚种的开发, 为马乳酒样乳杆菌在辅助精神障碍类疾病临床治疗和相关功能性食品的开发方面提供了理论基础。

参考文献

- [1] 孙也, 段晓薇, 高月宇, 潘娅婧, 侯旭彤, 肖萍, 王金菊, 王艳萍. *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 对应激小鼠行为学和体内生物标记物的作用. 食品科技, 2019, 44(9): 1-7.
Sun Y, Duan XW, Gao YY, Pan YJ, Hou XT, Xiao P, Wang JJ, Wang YP. Effects of *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 on behavior and biomarkers of stressed mice. *Food Science and Technology*, 2019, 44(9): 1-7. (in Chinese)
- [2] Walker ER, McGee RE, Druss BG. Mortality in mental disorders and global disease burden implications: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Psychiatry*,

- 2015, 72(4): 334–341.
- [3] Dattilio FM. Book Review. Barlow D. Anxiety and Its Disorders. New York: Guilford, 2002.
- [4] Ramirez K, Fornaguera-Trías J, Sheridan JF. Stress-induced microglia activation and monocyte trafficking to the brain underlie the development of anxiety and depression. Inflammation-associated depression: evidence, mechanisms and implications. Cham: Springer International Publishing, 2016: 155–172.
- [5] Xie Y, Huang X, Hu SY, Qiu XJ, Zhang YJ, Ren P, Wang Y, Ji H, Zhang CH, Xie WB, He J, Xie MZ, Huang HY, Liu ZQ, Zhou HH. Meranzin hydrate exhibits anti-depressive and prokinetic-like effects through regulation of the shared alpha 2-adrenoceptor in the brain-gut axis of rats in the forced swimming test. *Neuropharmacology*, 2013, 67: 318–325.
- [6] 李素水, 张翠芳, 张亚坤, 袁芳. 益生菌应用在神经精神障碍中的理论基础与前景展望. *河北医药*, 2021, 43(14): 2196–2200.
- Li SS, Zhang CF, Zhang YK, Yuan F. The theoretical basis and prospect of probiotics application in neuropsychiatric disorders. *Hebei Medical Journal*, 2021, 43(14): 2196–2200. (in Chinese)
- [7] Burokas A, Arbolea S, Moloney RD, Peterson VL, Murphy K, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Targeting the microbiota-gut-brain axis: prebiotics have anxiolytic and antidepressant-like effects and reverse the impact of chronic stress in mice. *Biological Psychiatry*, 2017, 82(7): 472–487.
- [8] 方家瑞, 李喆, 任邑昆, 王莹莹, 马珊珊, 关方霞. 肠道菌群-肠脑轴在神经退行性疾病发生和防治中的作用. *郑州大学学报: 医学版*, 2021, 56(3): 327–331.
- Fang JR, Li Z, Ren YK, Wang YY, Ma SS, Guan FX. The role of intestinal flora-enterobrain axis in the pathogenesis and prevention of neurodegenerative diseases. *Journal of Zhengzhou University: Medical Sciences*, 2021, 56(3): 327–331. (in Chinese)
- [9] 王文建, 郑跃杰. 肠道菌群与中枢神经系统相互作用及相关疾病. *中国微生态学杂志*, 2016, 28(2): 240–245.
- Wang WJ, Zheng YJ. Gut microbiota and central nervous system: research progress. *Chinese Journal of Microecology*, 2016, 28(2): 240–245. (in Chinese)
- [10] Lucie Lingrand, Annie Tremblay, Bérengère Feuz, Thomas A. Tompkins, 律冉, 程翔. 精神益生菌: 神经科学研究的转变, 从肠道作用到大脑. *中国食品科学技术学会. 第十五届益生菌与健康国际研讨会摘要集. 中国食品科学技术学会: 中国食品科学技术学会*, 2020: 3.
- Lucie L, Annie T, Berengere F, Thomas A. T, Lv R, Cheng X. Psychoprotiotics: the transformation of neuroscience research, from intestinal action to brain. Chinese Institute of Food Science and Technology. Abstracts from the 15th International Symposium on Probiotics and Health. Chinese Institute of Food Science and Technology: Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020: 3. (in Chinese)
- [11] Javelot H, Messaoudi M, Jacquelin C, Bisson JF, Rozan P, Nejd A, Lazarus C, Cassel JC, Strazielle C, Lalonde R. Behavioral and neurochemical effects of dietary methyl donor deficiency combined with unpredictable chronic mild stress in rats. *Behavioural Brain Research*, 2014, 261: 8–16.
- [12] Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of Psychiatric Research*, 2008, 43(2): 164–174.
- [13] Janik R, Thomason LAM, Stanisz AM, Forsythe P, Bienenstock J, Stanisz GJ. Magnetic resonance spectroscopy reveals oral *Lactobacillus* promotion of increases in brain GABA, N-acetyl aspartate and glutamate. *NeuroImage*, 2016, 125: 988–995.
- [14] 田培郡. 具有缓解抑郁功能的短双歧杆菌CCFM1025的研究. 江南大学博士学位论文, 2021.
- [15] 孙也, 潘娅婧, 杨菁楠, 侯旭彤, 王金菊, 王艳萍. 抗抑郁样及焦虑样行为乳酸菌的筛选. *食品研究与开发*, 2020, 41(9): 20–25.
- Sun Y, Pan YJ, Yang JN, Hou XT, Wang JJ, Wang YP. Screening for lactic acid bacteria of anti-depression-like/anti-anxiety-like behaviors. *Food Research and Development*, 2020, 41(9): 20–25. (in Chinese)
- [16] 王艳萍, 严婷, 王亚琦, 王远望, 王萌. 马乳酒样乳杆菌马乳酒样亚种及其研究进展. *微生物学报*, 2022, 62(2): 414–420.
- Wang YP, Yan T, Wang YQ, Wang YW, Wang M. *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* and its research progress. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 414–420. (in Chinese)
- [17] Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4(9): 775–790.
- [18] 王剑飞, 韩俊海, 张子超. 孤独症谱系障碍小鼠模型行为学检测方法. *遗传*, 2021, 43(5): 501–519.
- Wang JF, Han JH, Zhang ZC. Behavioral analyses in mouse models of autism spectrum disorders. *Hereditas: Beijing*, 2021, 43(5): 501–519. (in Chinese)

- [19] Tian PJ, Wang G, Zhao JX, Zhang H, Chen W. *Bifidobacterium* with the role of 5-hydroxytryptophan synthesis regulation alleviates the symptom of depression and related microbiota dysbiosis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2019, 66: 43–51.
- [20] McCloskey MC, Young TJ, Anderson SM. Research article: the influence of acetylcholinesterase on anxiety- and depression-like behaviors in fluoxetine-treated male mice. *BIOS*, 2017, 88(1): 29–38.
- [21] 王刚, 田培郡, 赵建新, 张灏, 陈卫. 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. 中国食品科学技术学会. 第十五届益生菌与健康国际研讨会摘要集. 中国食品科学技术学会: 中国食品科学技术学会, 2020: 2.
- Wang G, TIAN PJ, Zhao JX, ZHANG H, Chen W. *Bifidobacterium brevis* CCFM1025 relieves depressive symptoms and associated intestinal dysbiosis caused by mild chronic and unpredictable stress. Chinese Institute of Food Science and Technology. Abstracts from the 15th International Symposium on Probiotics and Health. Chinese Institute of Food Science and Technology: Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020: 2. (in Chinese)
- [22] Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2005, 29(4/5): 547–569.
- [23] Cryan JF, Mombereau C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular Psychiatry*, 2004, 9 (4): 326–357.
- [24] Liu YW, Liu WH, Wu CC, Juan YC, Wu YC, Tsai HP, Wang S, Tsai YC. Psychotropic effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 in early life-stressed and naïve adult mice. *Brain Research*, 2016, 1631: 1–12.
- [25] Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, Javelot H, Desor D, Nejdi A, Bisson JF, Rougeot C, Pichelin M, Cazaubiel M, Cazaubiel JM. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *The British Journal of Nutrition*, 2011, 105(5): 755–764.
- [26] Da Silva Moreira LK, De Brito AF, Da Silva DM, Siqueira L, Da Silva DPB, Cardoso CS, Florentino IF, De Carvalho PMG, Ghedini PC, Menegatti R, Costa EA. Potential antidepressant-like effect of piperazine derivative LQFM212 in mice: role of monoaminergic pathway and brain-derived neurotrophic factor. *Behavioural Brain Research*, 2021, 401: 113066.
- [27] Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in Immunology*, 2006, 27(1): 24–31.
- [28] 安书成, 安锋利. 5-羟色胺与应激反应及其抑郁症的关系. 陕西师范大学继续教育学报, 2006(1): 122–124.
- An SC, An FL. Relationship between 5-hydroxytryptamine and stress response and depression. *Journal of Further Education of Shaanxi Normal University*, 2006(1): 122–124. (in Chinese)
- [29] Abildgaard A, Elfving B, Hokland M, Wegener G, Lund S. Probiotic treatment reduces depressive-like behaviour in rats independently of diet. *Psychoneuroendocrinology*, 2017, 79: 40–48.
- [30] Liang S, Wang T, Hu X, Luo J, Li W, Wu X, Duan Y, Jin F. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS₈ improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience*, 2015, 310: 561–577.
- [31] 张翕婷, 王怡, 李霖, 陈婷, 邸晶蕊, 晏一淇, 张晗. 炎症因子与其他抑郁相关因素关系的研究现状. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(21): 2568–2571.
- Zhang XT, Wang Y, Li L, Chen T, Di JR, Yan YQ, Zhang H. Current situation of relationship between inflammatory factors and other depression-related factors. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2018, 34(21): 2568–2571. (in Chinese)
- [32] 蒋良, 邢文龙, 李林丰, 王晓磊, 张桂青. 血清炎症因子 IL-10、IFN- γ 与抑郁障碍的相关性. 中国老年学杂志, 2021, 41(3): 542–545.
- Jiang L, Xing WL, Li LF, Wang XL, Zhang GQ. Correlation between serum inflammatory cytokines IL-10 and IFN- γ and depressive disorder. *Chinese Journal of Gerontology*, 2021, 41(3): 542–545. (in Chinese)
- [33] 苏森森, 潘渠. 益生菌对宿主心理健康及脑功能的积极影响及其机制. 中国微生态学杂志, 2017, 29(4): 476–480, 493.
- Su SS, Pan Q. The positive influence of probiotics on mental health and brain function of host and the mechanisms. *Chinese Journal of Microecology*, 2017, 29(4): 476–480, 493. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)