

褐藻寡糖对慢性不可预知温和应激诱导的斑马鱼抑郁样行为及肠道菌群的影响

龙 妍^{1,2,3}, 石炎夏^{1,2,3}, 丘 岳¹, 农慧婷¹, 朱武娣¹, 苏宏梅¹, 何乃焕¹, 覃著文¹, 韦锦斌^{1,2,3}

(1. 广西医科大学药学院药理学教研室, 南宁 530021; 2. 广西生物活性分子研究与评价重点实验室, 南宁 530021; 3. 广西老年病防治药物基础研究重点实验室, 南宁 530021)

摘要 目的:探究褐藻寡糖(AOS)对慢性不可预知温和应激(CUMS)模型斑马鱼抑郁样行为及肠道菌群的影响。**方法:**将野生型AB品系斑马鱼随机分为正常组、模型组、阳性对照组和AOS低、中、高剂量(AOS-L、AOS-M、AOS-H)组, 每组24尾。除正常组外, 其余各组均接受14 d的CUMS建立斑马鱼抑郁样模型。除正常组和模型组给予等体积饲养水外, 其余各组于第8天开始每天浸泡60 min相应浓度的AOS。14 d后, 采用新型水箱测试(NTT)和明暗箱测试(LDB)进行行为实验, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测脑组织中5-羟色胺(5-HT)和去甲肾上腺素(NE)水平, 16s rRNA测序检测肠道菌群变化。**结果:**与模型组比较, 在NTT中, 阳性对照组和AOS-H组斑马鱼第1次进入顶部潜伏期显著缩短, 在顶部的时间显著延长, 进入顶部的次数显著增加(均 $P<0.01$), 活动范围扩大。与模型组比较, 在LDB中, 阳性对照组和AOS-H组斑马鱼第1次进入光亮区域的潜伏期显著缩短, AOS-M组和AOS-H组在光亮区域的持续时间显著延长, 阳性对照组和AOS各剂量组进入光亮区域的次数显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与正常组比较, 模型组体质量指数、5-HT和NE水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较, AOS-M组、AOS-H组体质量指数显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 阳性对照组和AOS-H组5-HT水平显著提高($P<0.01$)。AOS可以提高肠道菌群丰富度和多样性, 调节群落组成结构。在门水平上, 调节变形菌门、放线菌门、梭杆菌门和厚壁菌门等菌门的相对丰度。在属水平上, 调节鲸杆菌属、气单胞菌属、邻单胞菌属、未分类根瘤菌属和根瘤菌属菌群等菌属的相对丰度。影响肠道中碳代谢、嘌呤代谢和丙酮酸代谢等代谢功能及相关物质转运过程。**结论:**AOS能改善CUMS斑马鱼抑郁样行为, 增加体质量指数, 其作用与调节神经递质、肠道菌群组成及其代谢和物质转运功能有关。

关键词 褐藻寡糖; 斑马鱼; 慢性不可预知温和应激; 神经递质; 肠道菌群

中图分类号: R749.4 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2024)07-1025-10

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.07.012

Effects of alginate oligosaccharides on depression-like behavior and gut microbiota in zebrafish induced by chronic unpredictable mild stress

LONG Yan^{1,2,3}, SHI Yanxia^{1,2,3}, QIU Yue¹, NONG Huiting¹, ZHU Wuchang¹, SU Hongmei¹, HE Naihuan¹, QIN Zhuwen¹, WEI Jinbin^{1,2,3}. (1. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi key laboratory of Bioactive Molecules Research and Evaluation, Nanning 530021, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Basic Research on Drugs for Prevention and Treatment of Geriatric Diseases, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of alginate oligosaccharides (AOS) on depression-like behavior and gut microbiota in zebrafish, a model of chronic unpredictable mild stress (CUMS). **Methods:** Wild-type AB strain zebrafish were randomly divided into normal, model, positive control and AOS low, medium and high dose (AOS-L, AOS-M, AOS-H) groups, with 24 fish in each group. All groups, except the normal group, received 14 d of CUMS to establish a zebrafish depression-like model. Except for the normal and model groups, which were given equal volumes of rearing water, the remaining groups were immersed in the corresponding concentrations of AOS for 60 min daily starting from day 8. After 14 d, behavioral experiments were conducted using the novel tank test (NTT) and light-dark tank test (LDB), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and norepinephrine (NE) in the brain tissues, and 16s rRNA sequencing was used to detect the changes in gut microbiota. **Results:** Compared with the model group, in the

[基金项目] 广西北部湾特色海洋资源生物医药关键技术研究和高值利用基金资助项目(No. 防科AA22013003)

[通信作者] 韦锦斌, E-mail: wjbguangxi@sina.cn

[收稿日期] 2024-05-31

NTT, zebrafish in the positive control group and the AOS high dose group had significantly shorter latency for the first entry into the top, significantly longer time in the top, and significantly increased the number of entries into the top (both $P < 0.01$), and expanded the range of motion. Compared with the model group, in the LDB, the positive control group and the AOS high dose group significantly shortened the latency of the zebrafish's first entry into the shiny area, the AOS medium dose group and the AOS high dose group were also able to significantly increased the duration of the time in the shiny area ($P < 0.01$), the positive control group and each of the AOS groups were also able to significantly increased the number of entries into the shiny area ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Body mass index, 5-HT and NE levels were significantly lower in the model group compared with the normal group ($P < 0.01$). Compared with the model group, body mass index was significantly increased in the AOS-M, AOS-H groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); 5-HT levels were significantly increased in the positive control group and the AOS high dose group ($P < 0.01$). AOS could increase the abundance and diversity of gut microbiota and regulate the structure of community composition. At the phylum level, it regulated the relative abundance of *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Fusobacteriota* and *Firmicutes*. At the genus level, it regulated the relative abundance of genera such as *Cetobacterium*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *unclassified_f_Rhizobiaceae* and *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*. Metabolic functions such as carbon metabolism, purine metabolism and pyruvate metabolism, as well as related substance transport processes in the gut were influenced. **Conclusion:** AOS can ameliorate depressive-like behavior and increase body mass index in CUMS zebrafish, and its effects are related to the modulation of neurotransmitters, the composition of the gut microbiota, and their metabolic and substance transport functions.

Keywords alginate oligosaccharides; zebrafish; chronic unpredictable mild stress; neurotransmitters; gut microbiota

抑郁症是一种常见的精神障碍,抑郁发作以其处境不相称的心境低落为主,伴随兴趣缺乏、思维迟缓、睡眠障碍和食欲异常等症状,甚至出现自残与自杀行为^[1]。据世界卫生组织统计,全球抑郁症患者已超3.5亿人,每年有超70万人死于抑郁症引起的自杀,预计至2030年抑郁症将成为全球疾病负担第一位^[2]。临床上治疗抑郁症的主要方式为药物治疗,作用机制多以调节中枢神经系统中单胺类神经递质为主,存在作用靶点单一、不良反应明显和延迟起效等缺陷^[3]。随着“微生物—肠—脑”轴理论的提出,近期研究发现肠道菌群可通过改变宿主代谢、调节神经递质、神经内分泌和神经免疫等途径影响大脑功能和宿主行为^[4],为抑郁症的发病机制和新药研发提供了新思路。

褐藻胶广泛存在于海带、巨藻和鹿角菜等褐藻的细胞壁及细胞基质中,褐藻寡糖(alginate oligosaccharides, AOS)是通过裂解褐藻胶制得的海洋天然活性低聚物,具有分子量小、水溶性高和生物利用度高等特点^[5]。大量研究表明,AOS通过抑制神经炎症反应、氧化应激和神经细胞凋亡等途径发挥神经保护作用^[6]。抑郁症是许多神经系统疾病中常见的精神症状,且存在复杂而共有的调控机制。然而,目前关于AOS对抑郁症的影响未见报道。斑马

鱼是一种新兴的脊椎模式生物,具有体型小、繁殖周期短、饲养成本低等优点,其大脑与肠道特征与人类高度一致和进化保守,并具有丰富的社会行为^[7]。慢性不可预知温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)诱导的斑马鱼抑郁模型已被广泛用于抗抑郁药物的筛选和抑郁症病理生理机制的实验研究^[8]。因此,本实验探讨AOS对CUMS诱导的斑马鱼抑郁模型的作用及机制,为抗抑郁药物的开发及利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8月龄野生型AB品系斑马鱼,雌雄各半,购自广西羿晟生物科技有限公司;饲养于广西医科大学斑马鱼人类疾病新模式动物生物医药研发平台,环境室温(26 ± 1)℃,光周期14 h:10 h(光照:黑暗),每天喂食2次新鲜孵化的丰年虾。饲养水经斑马鱼养殖系统自动进行循环、消毒、过滤、曝气除氯等处理。

1.2 材料与试剂

AOS(MW $\leq 4\ 000$ Da,批号:2023070301AYF,青岛博智汇力生物科技有限公司);盐酸氟西汀胶

囊(批号:C0722022004,上海上药中西制药有限公司);斑马鱼 5-羟色胺(5-HT)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,货号:JM-07923F1);斑马鱼去甲肾上腺素(NE)ELISA 检测试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,货号:JM-07894F1)。感谢广西壮族自治区北部湾海洋生物医药精准开发和高值利用工程研究中心提供实验平台。

1.3 主要仪器

实验级水生模式斑马鱼养殖设备(型号 ESEN-AW-DU5,北京爱生科技发展有限公司)、斑马鱼行为分析仪(型号 Danio Vison,Noldus 公司)、多功能

酶标仪(型号 Synergy H1,美国伯腾仪器有限公司)。

1.4 动物模型的建立及分组给药

野生型 AB 品系斑马鱼随机分为 6 组:正常组、模型组、阳性对照组^[9](0.1 mg/L 氟西汀)、AOS 低剂量组(125 mg/L, AOS-L 组)、AOS 中剂量组(250 mg/L, AOS-M 组)和 AOS 高剂量组(500 mg/L, AOS-H 组)^[10],每组 24 尾。除正常组外,其余各组均进行 CUMS 处理,见表 1^[11-12],连续 14 d,每天随机采用两种不同的应激方式,避免连续 2 d 安排同种应激方式以产生适应性。从第 8 天开始,各给药组给予相应浓度的药物,正常组和模型组给予等体积饲养水,浸泡处理 60 min,1 次/d,连续 7 d。

表1 CUMS方法

序号	应激方法	操作过程	持续时间
1	约束	将斑马鱼单独置于 10 mL 离心管中,水位没过斑马鱼	10 min
2	加热	将斑马鱼置于水温为 33 ℃ 的鱼缸中	30 min
3	冷却	将斑马鱼置于水温为 23 ℃ 的鱼缸中	30 min
4	社会隔离	将斑马鱼单独置于含 100 mL 水的 250 mL 不透明塑料杯中	60 min
5	警示素	将斑马鱼置于含有鱼皮组织的水中	30 min
6	拥挤	将 10 尾斑马鱼置于含 150 mL 水的 250 mL 不透明塑料杯中	60 min
7	背侧暴露	降低水位至暴露斑马鱼的背部及侧部	2 min
8	网追	用渔网追逐斑马鱼	8 min
9	持续光照	将斑马鱼置于光亮处	24 h
10	更换鱼缸	将斑马鱼置于 6 种不同形状大小的容器中,在每种容器中保持 8 min 后更换另一种容器	8 min

1.5 行为学测试

1.5.1 新型水箱测试(novel tank test, NTT)^[12]

NTT 是从整体运动、向上探索和冻结来评估斑马鱼的抑郁样行为。NTT 设备为一个透明 PVC 水箱(长 26 cm×宽 5 cm×高 20 cm),将水箱虚拟地分为上下两个相等的部分,上部分为顶部,下部分为底部。水箱正面放置连接电脑的摄像头进行 5 min 影像采集。通过动物运动轨迹跟踪系统(EthoVision XT, Noldus)分析斑马鱼第 1 次进入顶部潜伏期、在顶部的时间和进入顶部的次数,并生成轨迹热区图。

1.5.2 明暗箱测试(light dark box test, LDB)^[13]

LDB 是基于斑马鱼对黑暗环境的自然偏好特性而设计的行为实验。LDB 设备为一个分为光亮和黑暗两个区域的 PVC 水箱(长 26 cm×宽 20 cm×高 18 cm),两个区域的面积相等,中间设置一个可抽离分隔板。测试时将斑马鱼单独放入黑暗区域适应 2 min 后,抽出分隔板,进行 5 min 影像采集。

分析斑马鱼第 1 次进入光亮区域的潜伏期、在光亮区域的时间和进入光亮区域的次数。

1.6 体质量指数检测及样本采集

取材前禁食 12 h,以三卡因麻醉后,记录斑马鱼体重和体长,计算体质量指数=体重/体长(g/cm³)^[14]。随后于冰面上轻柔取出脑组织和肠道组织(8 尾斑马鱼肠道混合为 1 个样本),于-80 ℃冰箱保存。

1.7 神经递质水平的检测

取斑马鱼脑组织,按质量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入对应体积的预冷生理盐水,在 4 ℃ 条件下,用研磨仪将组织研磨均匀后,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液。根据试剂盒说明书操作步骤检测 5-HT 和 NE 水平。

1.8 16s rRNA 高通量测序

取正常组、模型组、阳性对照组和 AOS-H 组的肠道样本送至上海美吉生物医药科技有限公司进行测序,每组 3 个样本。采用 DNA 抽提试剂盒提取总 DNA 并检测质量,通过 338F(5'-ACTCCTACG-

GGAGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVG-GGTWTCTAAT-3')引物对细菌16s rRNA的V3~V4可变区进行PCR扩增。收集PCR扩增产物,进行产物鉴定、纯化及定量。构建PE文库并利用Illumina MiSeq PE300平台进行测序,通过使用fastp(<https://github.com/OpenGene/fastp>, version 0.20.0)软件对原始测序序列进行质控,使用FLASH(<http://www.cbc.umd.edu/software/flash>, version 1.2.7)软件进行拼接。使用Qiime 2流程中的DADA2插件对质控拼接之后的优化序列进行降噪处理,对扩增子序列变体(ASVs)进行分类学分析。

1.9 统计学方法

本实验数据应用SPSS 24.0软件进行统计分析,采用GraphPad Prism 8软件作图。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐时,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验;方差不齐时,采用非参数秩和检验;以 $P < 0.05$ 为差

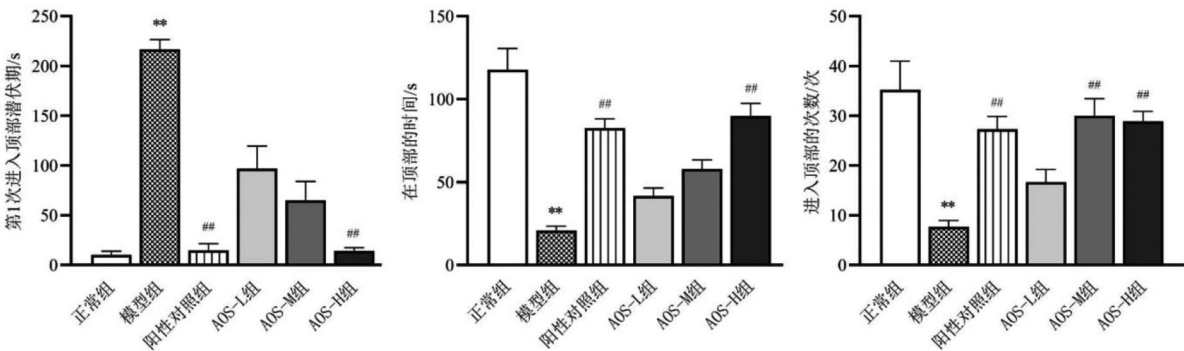
异有统计学意义。肠道菌群相关数据分析均在美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com>)上进行。

2 结果

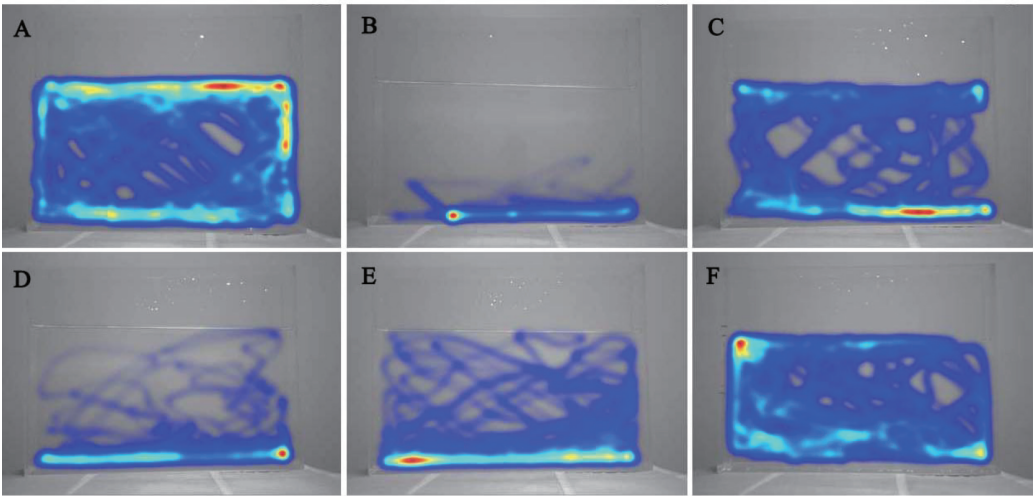
2.1 AOS对CUMS斑马鱼在NTT中的影响

与正常组比较,模型组第1次进入顶部潜伏期显著延长,在顶部的时间和进入顶部的次数显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组和AOS-H组第1次进入顶部潜伏期显著缩短,在顶部的时间和进入顶部的次数显著增加($P < 0.01$),见图1。

轨迹热区图结果显示,正常组斑马鱼活动范围广,水箱顶部颜色较深。模型组斑马鱼仅在水箱底部活动。阳性对照组斑马鱼活动范围广,水箱底部颜色较深。AOS-L组斑马鱼在水箱底部活动多,活动范围小。AOS-M组斑马鱼活动范围较广,但在水箱底部活动较顶部多。AOS-H组斑马鱼活动与正常组类似,见图2。



与正常组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,## $P < 0.01$ 。
图1 AOS对斑马鱼在NTT中的影响

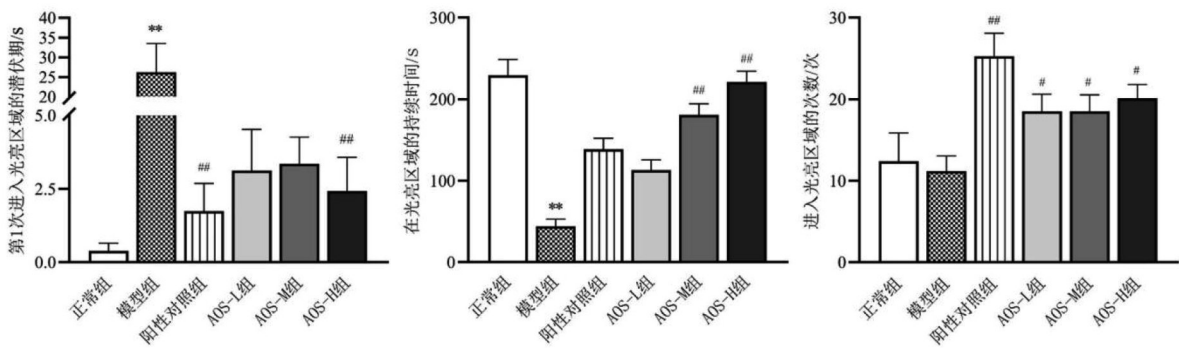


A: 正常组;B: 模型组;C: 阳性对照组;D: AOS-L组;E: AOS-M组;F: AOS-H组。
图2 NTT轨迹热区图

2.2 AOS对CUMS斑马鱼在LDB中的影响

与正常组比较,模型组第1次进入光亮区域的潜伏期显著延长,在光亮区域的持续时间显著缩短($P<0.01$),但进入光亮区域的次数没有显著性差异($P>0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和AOS-H

组斑马鱼第1次进入光亮区域的潜伏期显著缩短($P<0.01$),AOS-M组和AOS-H组在光亮区域的持续时间显著延长($P<0.01$),阳性对照组和AOS各剂量组进入光亮区域的次数均显著增加($P<0.05$),见图3。



与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图3 AOS对斑马鱼在LDB中的影响

2.3 AOS对CUMS斑马鱼体质量指数的影响

与正常组(0.043 ± 0.006 g/cm²)比较,模型组体质量指数(0.032 ± 0.005 g/cm²)显著降低($P<0.01$);模型组(0.032 ± 0.005 g/cm²)与阳性对照组(0.036 ± 0.004 g/cm²)比较无显著差异($P>0.05$),而AOS-L组(0.035 ± 0.003 g/cm²)、AOS-M组(0.037 ± 0.004 g/cm²)、AOS-H组(0.039 ± 0.005 g/cm²)体质量指数均较模型组显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 AOS对CUMS斑马鱼脑组织神经递质的影响

与正常组比较,模型组5-HT和NE水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,阳性对照组和AOS-H组5-HT水平显著提高($P<0.01$),见表2。

表2 AOS对斑马鱼脑内神经递质的影响

$\bar{x}\pm s, n=12$		
组别	5-HT/(ng/mL)	NE/(pg/mL)
正常组	191.50±11.77	2 335.00±328.70
模型组	132.60±9.34**	1 711.00±342.40**
阳性对照组	169.70±14.08##	1 868.00±166.60
AOS-L组	145.10±8.60	1 818.00±227.10
AOS-M组	161.30±12.29	1 828.00±195.50
AOS-H组	181.50±8.05##	2 132.00±421.30

与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

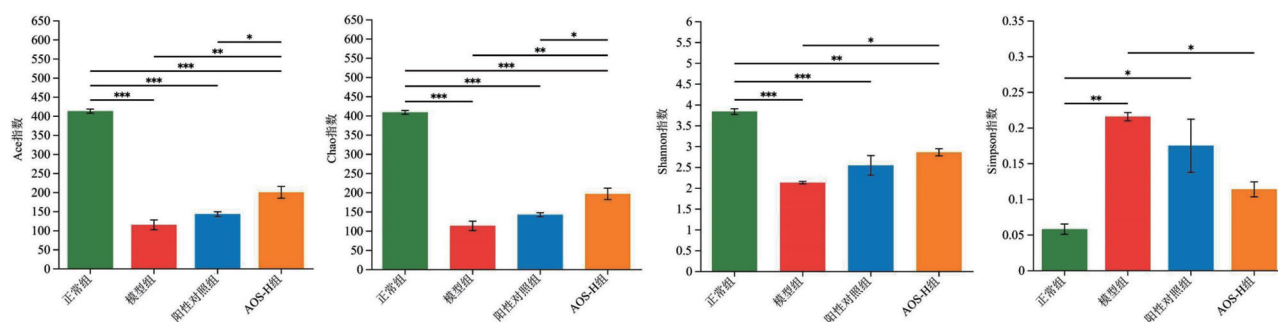
2.5 AOS对CUMS斑马鱼肠道菌群的影响

2.5.1 Alpha多样性分析 与正常组相比,模型组

Ace、Chao和Shannon指数均显著降低,Simpson指数显著升高($P<0.01$);阳性对照组与模型组Ace、Chao、Shannon和Simpson指数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。AOS-H组Ace、Chao($P<0.01$)和Shannon($P<0.05$)指数均显著升高,且Simpson指数显著降低($P<0.05$),见图4。

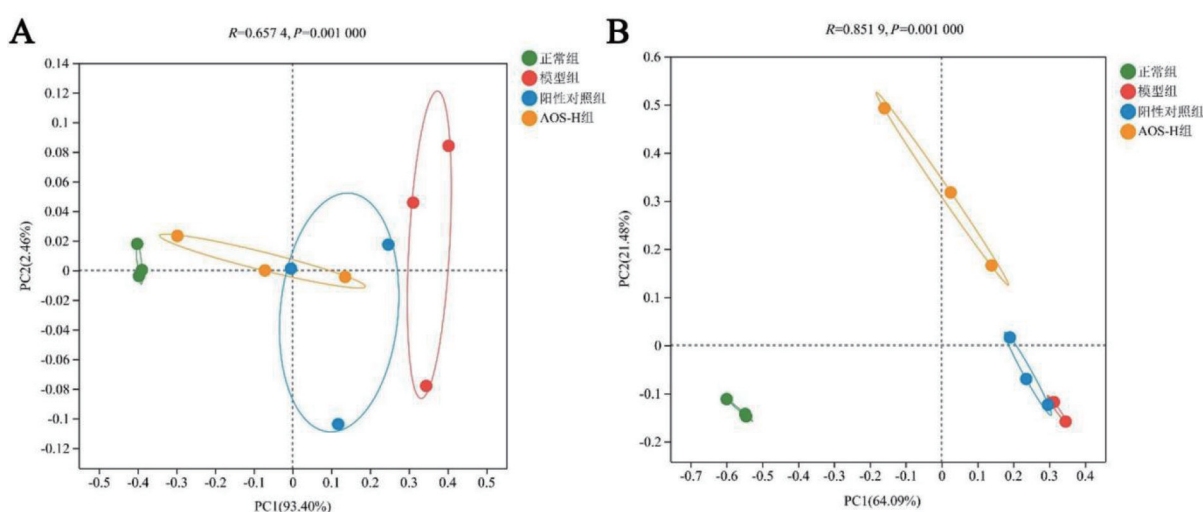
2.5.2 Beta多样性分析 主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)结果显示,在各水平上,正常组与其他组明显区分,且与模型组距离最远;在门水平上,AOS-H组与正常组距离较近,而阳性对照组与模型组距离较近;在属水平上,阳性对照组与模型组距离较近,见图5。

2.5.3 基于门水平的群落组成分析 结果显示,各组斑马鱼肠道菌群主要由Proteobacteria(变形菌门)、Fusobacteriota(梭杆菌门)、Actinobacteriota(放线菌门)、Verrucomicrobiota(疣微菌门)、Firmicutes(厚壁菌门)及其他组成,但各组菌门相对丰度存在差异。与正常组相比,模型组斑马鱼肠道中的变形菌门($P<0.01$)、放线菌门($P<0.05$)和疣微菌门的相对丰度降低,梭杆菌门($P<0.001$)和厚壁菌门的相对丰度增加。与模型组相比,AOS-H组变形菌门($P<0.05$)和放线菌门的相对丰度增加,梭杆菌门($P<0.05$)和厚壁菌门的相对丰度降低,而疣微菌门的相对丰度差异无统计学意义($P>0.05$);阳性对照组的各菌门相对丰度变化趋势与AOS-H组一致,但均无统计学差异($P>0.05$),见图6。



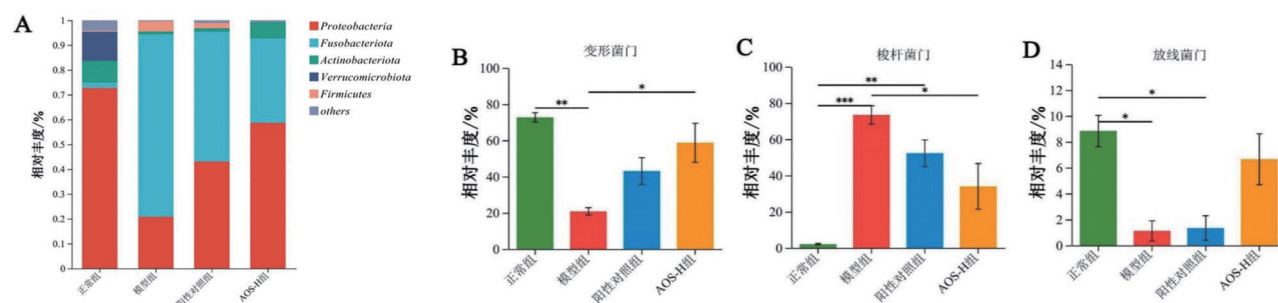
组间比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图4 各组斑马鱼肠道菌群图Alpha多样性指数分析



A:在门水平的PcoA分析;B:在属水平的PcoA分析。

图5 各组斑马鱼肠道菌群Beta多样性分析



A:门水平的群落组成柱状图;B:各组变形菌门的比例;C:各组梭杆菌门的比例;D:各组放线菌门的比例;组间比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图6 门水平的群落组成分析

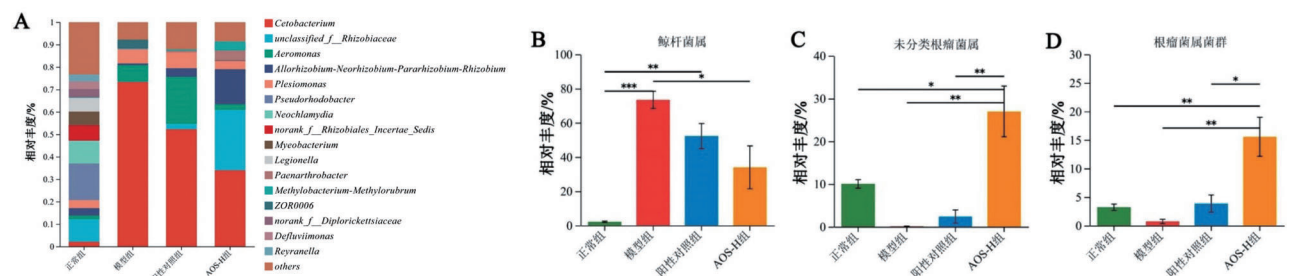
2.5.4 基于属水平的群落组成分析 各组斑马鱼肠道菌群的优势菌属为 *Cetobacterium* (鲸杆菌属)、*unclassified_f_Rhizobiaceae* (未分类根瘤菌属)、*Aeromonas* (气单胞菌属)、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (根瘤菌属菌群)、*Plesiomonas* (邻单胞菌属)。与正常组相比,模型组鲸

杆菌属($P<0.001$)、气单胞菌属和邻单胞菌属的相对丰度增加,未分类根瘤菌属和根瘤菌属菌群的相对丰度降低。与模型组相比,阳性对照组鲸杆菌属的相对丰度降低,未分类根瘤菌属、气单胞菌属、根瘤菌属菌群和邻单胞菌属的相对丰度增加,但差异均无统计学意义($P>0.05$);AOS-H组鲸杆菌属

($P<0.05$)、气单胞菌属和邻单胞菌属的相对丰度降低,未分类根瘤菌属和根瘤菌属菌群($P<0.01$)的相对丰度显著增加,见图7。

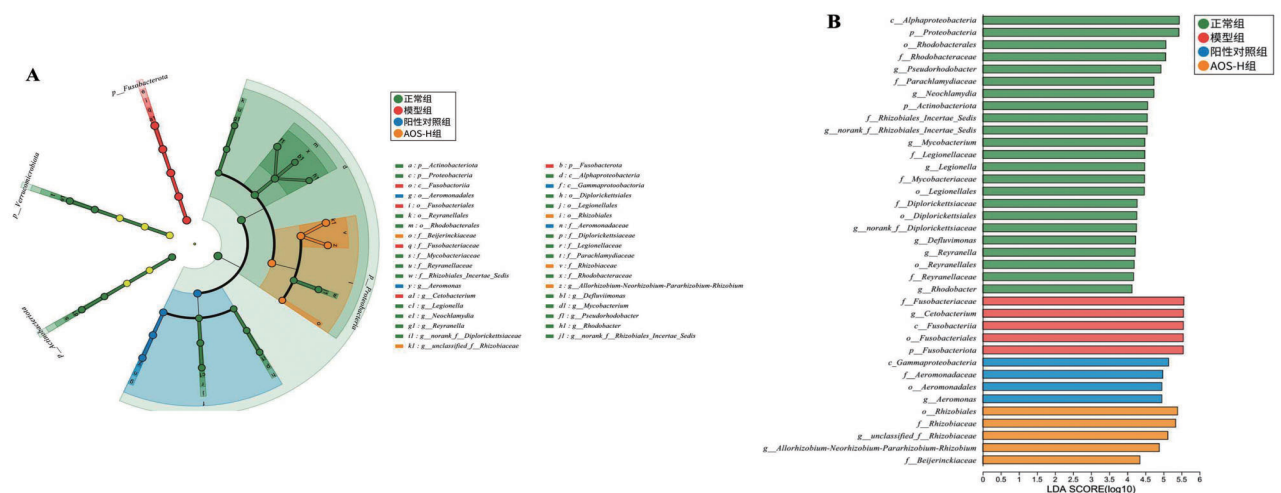
2.5.5 物种分类差异分析 利用线性判别分析效应大小(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)分析方法,设定线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)阈值为4,比较各组斑马鱼肠道菌群丰度在各分类层级上的物种差异。结果显示,正常组共鉴定出23个优势差异物种,其中*c__Alphaproteobacteria*(α -变形菌纲)和*p__Proteobacteria*(变形菌门)的相对占比丰度较高。模型组有5个优势差异物种,分别为*f__Fusobacteriaceae*(梭杆菌科)、

g__Cetobacterium(鲸杆菌属)、*c__Fusobacteriia*(梭杆菌纲)、*o__Fusobacteriales*(梭杆菌目)和*p__Fusobacteriota*(梭杆菌门)。阳性对照组有4个优势差异物种,分别为*c__Gammaproteobacteria*(γ -变形菌纲)、*f__Aeromonadaceae*(气单胞菌科)、*o__Aeromonadales*(气单胞菌目)和*g__Aeromonas*(气单胞菌属)。AOS-H组有5个优势差异物种,分别为*o__Rhizobiales*(根瘤菌目)、*f__Rhizobiaceae*(根瘤菌科)、*g__unclassified_f__Rhizobiaceae*(未分类根瘤菌属)、*g__Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*(根瘤菌属菌群)和*f__Beijerinckiaceae*(拜叶林克氏菌属),见图8。



A: 属水平的群落组成柱状图; B: 各组鲸杆菌属的比例; C: 各组未分类根瘤菌属的比例; D: 各组根瘤菌属菌群的比; 组间比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图7 属水平的群落组成分析



A: LEfSe 多级物种层级树图; B: LDA 判别柱状图。

图8 各组斑马鱼肠道菌群物种分类差异分析

2.5.6 KEGG 通路预测分析 采用PICRUST2对各组斑马鱼肠道菌群的KEGG三级通路进行功能预测,图9展示了丰度排行前20的差异表达通路($P<0.05$)。发现CUMS主要影响代谢途径(metabolic pathways)、次生代谢物的生物合成(biosynthesis of

secondary metabolites)、ABC 转运蛋白(ABC transporters)、氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)、碳代谢(carbon metabolism)、核糖体(ribosome)、嘌呤代谢(purine metabolism)、丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)、氨基糖和核苷酸糖代谢

(amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)和嘧啶代谢(pyrimidine metabolism)等多种功能表达,而AOS处理后能够使上述代谢通路功能调节至与正常组水平相当。

2.5.7 COG功能注释分析 结果显示,各组样本的COG功能主要集中于氨基酸运输和代谢(amino ac-

id transport and metabolism)、能量产生和转化(energy production and conversion)、无机离子运输和代谢(inorganic ion transport and metabolism)、翻译、核糖体结构和生物发生(translation, ribosomal structure and biogenesis)和碳水化合物运输和代谢(carbohydrate transport and metabolism)等方面,并可见各项COG功能在各组样本中的丰度信息不同,见图10。

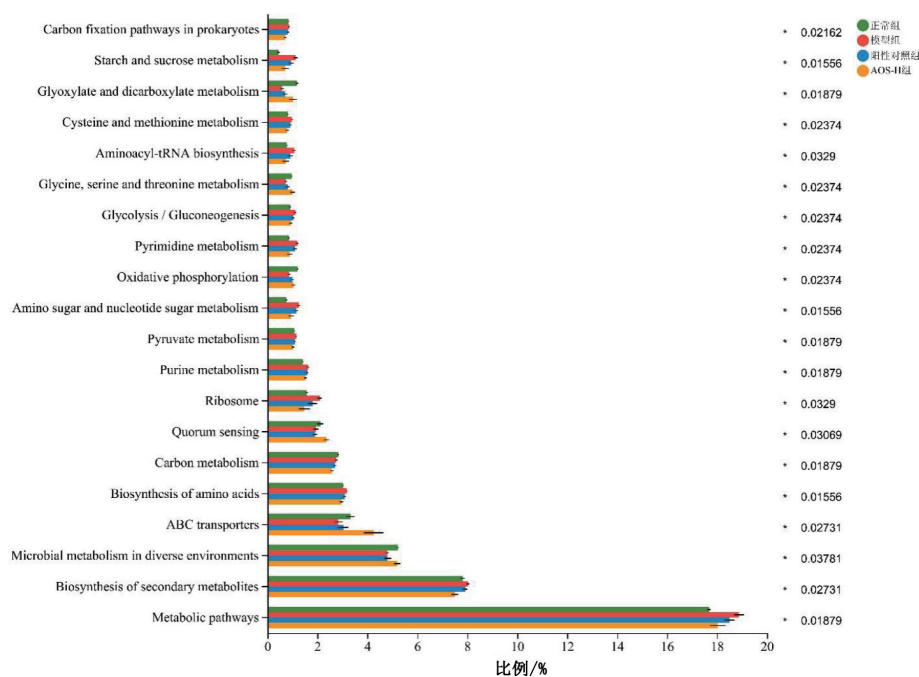


图9 差异表达KEGG通路预测图

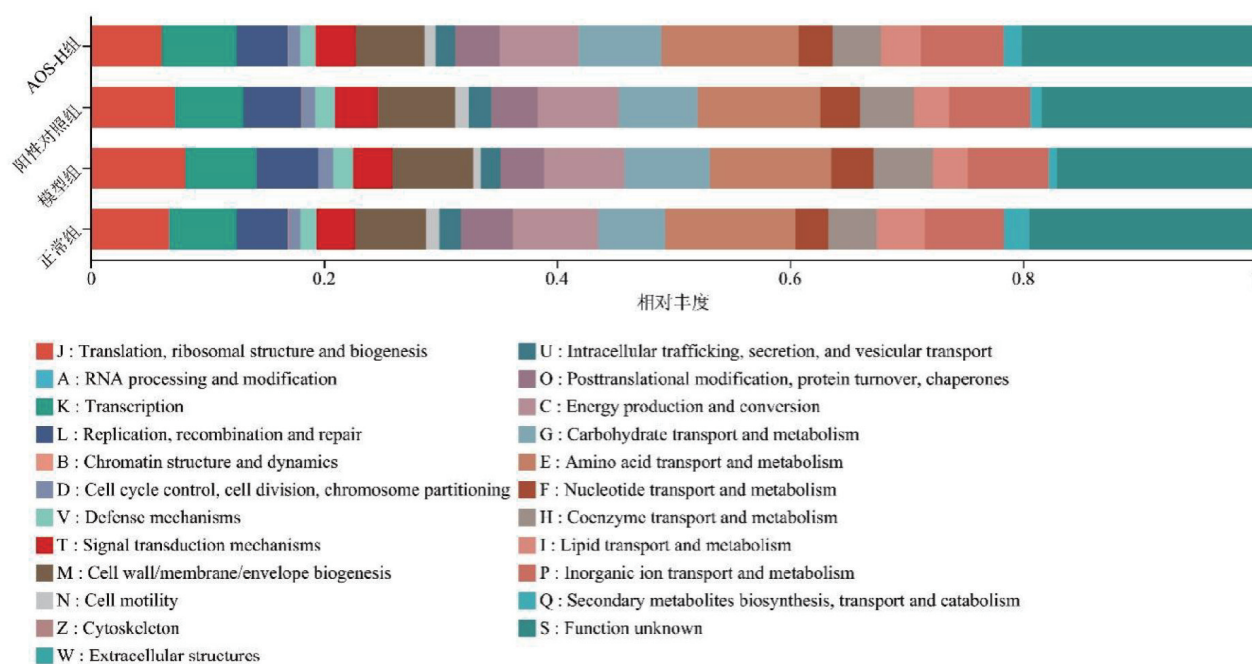


图10 各组斑马鱼肠道菌群物种分类差异分析

3 讨 论

抑郁症的核心症状之一是兴趣缺失,在实验动物模型中表现为对新环境、新事物的探索行为减少^[15]。研究表明,在NTT中,经CUMS诱导的斑马鱼第1次进入顶部潜伏期显著延长,在顶部的持续时间和进入顶部的次数显著减少^[16],与本实验模型组结果一致。与模型组相比,阳性对照组和AOS-H组均能逆转上述行为改变。此外,斑马鱼倾向于停留在黑暗区域以躲避潜在伤害,其趋暗行为增加则反映抑郁程度加深。在LDB中,与模型组相比,阳性对照组和AOS-H组斑马鱼第1次进入光亮区域的潜伏期显著缩短,进入光亮区域的次数明显增加,AOS-H组在光亮区域的时间显著延长。说明AOS能够改善CUMS诱导的斑马鱼抑郁样行为。

研究表明,经长期应激的斑马鱼会出现减少进食而致体重减轻的情况^[17],与本实验模型组结果一致。经AOS处理后,能显著提高体质量指数,且呈剂量依赖性。说明AOS能够改善CUMS导致的体质量指数下降,该变化可能与调节机体营养状况和肠道菌群失衡有关。

长期以来,抑郁症的发病机制以单胺类神经递质假说为主流,神经细胞突触间隙的单胺类神经递质水平下降会出现情绪低落、兴趣丧失和精力减退等抑郁症状^[18]。本实验中,与正常组比较,模型组脑组织5-HT和NE水平显著降低,而给予高剂量AOS处理后,5-HT水平显著提高。同时,AOS-H组NE水平也有一定程度的提高。表明AOS能够改善CUMS诱导的5-HT、NE水平下降,提示调节神经递质可能是其发挥抗抑郁作用的潜在机制之一。

肠道菌群通过神经内分泌、神经免疫信号传导等途径参与肠道和大脑之间的双向通信^[19]。长期应激会引起宿主肠道菌群紊乱,增加抑郁症易感性^[20]。本实验中,与正常组相比,模型组斑马鱼肠道菌群丰富度和多样性显著降低,群落组成与正常组存在显著差异,与临床研究^[21]结果一致。在门水平上,模型组斑马鱼肠道变形菌门、放线菌门和疣微菌门的相对丰度降低,而梭杆菌门和厚壁菌门的相对丰度增加;在属水平上,模型组鲸杆菌属、气单胞菌属和邻单胞菌属的相对丰度显著增加,而未分类根瘤菌属、根瘤菌属菌群的相对丰度显著降低。上述的结果与先前研究一致^[22-24]。经AOS处理后,肠道菌群丰富度和多样性显著增加,并在一定程度上

恢复菌群结构的异常改变。有研究表明,与正常组比较,CUMS大鼠肠道菌群中根瘤菌科的相对丰度显著降低^[25]。在LefSe分析中,AOS-H组根瘤菌目和根瘤菌科丰度显著增加,提示根瘤菌目及其下属科和属可能是AOS改善抑郁状态的关键菌群。研究发现,抑郁症通常伴有机体代谢功能紊乱^[26],与本实验模型组结果一致。通过KEGG和GO分析发现,经AOS处理后能够回调CUMS导致的代谢通路和物质转运过程异常,主要涉及碳代谢、嘌呤代谢、丙酮酸代谢和氨基酸运输和代谢等途径。说明AOS能够调节群落组成结构并恢复其相关的代谢和物质转运功能。

综上所述,AOS具有一定的抗抑郁作用,其能够逆转CUMS诱导的斑马鱼抑郁样行为和体质量指数下降,机制可能与调节神经递质水平和肠道菌群组成及其代谢和物质转运功能有关。AOS可能具有成为安全、有效的抗抑郁药的潜力。

参考文献:

- [1] MCCARRON R M, SHAPIRO B, RAWLES J, et al. Depression[J]. *Annals of internal medicine*, 2021, 174(5): 65-80.
- [2] WORLD HEALTH O. Depression and other common mental disorders: global health estimates[R]. Geneva: world health organization, 2017.
- [3] MONTGOMERY S A. Tolerability of serotonin norepinephrine reuptake inhibitor antidepressants[J]. *CNS spectrums*, 2008, 13(7): 27-33.
- [4] LIU L, WANG H, CHEN X, et al. Gut microbiota and its metabolites in depression: from pathogenesis to treatment[J]. *EBiomedicine*, 2023, 90: 104527.
- [5] BI D, YANG X, LU J, et al. Preparation and potential applications of alginate oligosaccharides[J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2023, 63(29): 10130-10147.
- [6] WAN J, ZHANG J, XU Q, et al. Alginate oligosaccharide protects against enterotoxigenic escherichia coli-induced porcine intestinal barrier injury[J]. *Carbohydrate polymers*, 2021, 270: 118316.
- [7] ADEDARA I A, MOHAMMED K A, CANZIAN J, et al. Utility of zebrafish-based models in understanding molecular mechanisms of neurotoxicity mediated by the gut-brain axis[J]. *Advances in neurotoxicology*, 2024, 11: 177-208.
- [8] ZHANG R, QIAO C, LIU Q, et al. A reliable high-throughput screening model for antidepressant[J]. *International*

- journal of molecular sciences, 2021, 22(17): 9505.
- [9] SONG C, LIU B-P, ZHANG Y-P, et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology[J]. Progress in neuro- psychopharmacology and biological psychiatry, 2017, 81: 384-394.
- [10] HYO H K, BIPIN V, SE-YOUNG C, et al. Anti-hyperglycemic potential of alginate oligosaccharide in a high glucose- induced zebrafish model[J]. Journal of functional foods, 2022, 94: 105098.
- [11] PIATO Â L, CAPIOTTI K M, TAMBORSKI A R, et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (Danio rerio): behavioral and physiological responses[J]. Progress in neuro- psychopharmacology and biological psychiatry, 2011, 35(2): 561-567.
- [12] SANTOS SAMPAIO T I, MELO N C, FREITAS PAIVA B T, et al. Leaves of Spondias mombin L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (Danio rerio)[J]. Journal of ethnopharmacology, 2018, 224: 563-578.
- [13] ABDUL RAHIM N, NORDIN N, AHMAD RASEDI N I S, et al. Behavioral and cortisol analysis of the anti-stress effect of Polygonum minus (Huds) extracts in chronic unpredictable stress (CUS) zebrafish model[J]. Comparative biochemistry and physiology c: toxicology & pharmacology, 2022, 256: 109303.
- [14] MONTALBANO G, MANIA M, GUERRERA M C, et al. Morphological differences in adipose tissue and changes in BDNF/Trkb expression in brain and gut of a diet induced obese zebrafish model[J]. Annals of anatomy, 2016, 204: 36-44.
- [15] COOPER J A, ARULPRAGASAM A R, TREADWAY M T. Anhedonia in depression: biological mechanisms and computational models[J]. Current opinion in behavioral sciences, 2018, 22: 128-135.
- [16] ZHANG Y, WANG D, LIU J, et al. Structural characterization and antidepressant-like effects of polygonum sibiricum polysaccharides on regulating microglial polarization in chronic unpredictable mild stress-induced zebrafish[J]. International journal of molecular sciences, 2024, 25(4): 2005.
- [17] BENSI N, BERTUZZI M, ARMARIO A, et al. Chronic immobilization stress reduces sodium intake and renal excretion in rats[J]. Physiology & behavior, 1997, 62(6): 1391-1396.
- [18] HAO S, SHI W, LIU W, et al. Multiple modulatory roles of serotonin in chronic pain and injury-related anxiety[J]. Frontiers in synaptic neuroscience, 2023, 15: 1122381.
- [19] GALLAND L. The gut microbiome and the brain[J]. Journal of medicinal food, 2014, 17(12): 1261-1272.
- [20] TAN X, ZHANG L, WANG D, et al. Influence of early life stress on depression: from the perspective of neuroendocrine to the participation of gut microbiota[J]. Aging-US, 2021, 13(23): 25588-25601.
- [21] AVERINA O V, ZORKINA Y A, YUNES R A, et al. Bacterial metabolites of human gut microbiota correlating with depression[J]. International journal of molecular sciences, 2020, 21(23): 9234.
- [22] ZHANG Y, HUANG R, CHENG M, et al. Gut microbiota from NLRP3- deficient mice ameliorates depressive-like behaviors by regulating astrocyte dysfunction via circHIPK2[J]. Microbiome, 2019, 7(1): 116.
- [23] ZHANG Y, HUANG J, XIONG Y, et al. Jasmine tea attenuates chronic unpredictable mild stress- induced depressive-like behavior in rats via the gut-brain axis[J]. Nutrients, 2021, 14(1): 99.
- [24] CHEN Y, LE D, XU J A-O, et al. Gut Microbiota Dysbiosis and Inflammation Dysfunction in Late- Life Depression: An Observational Cross-Sectional Analysis[J]. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2024, 2024(20): 399-414.
- [25] 吕 梦. 基于肠道菌群和粪便代谢组学的逍遥散及其功效药队抗抑郁作用比较研究[D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [26] WANG Y, CAI X, MA Y, et al. Metabolomics on depression: A comparison of clinical and animal research[J]. Journal of affective disorders, 2024, 349: 559-568.

本文引用格式:

龙 妍, 石炎夏, 丘 岳, 等. 褐藻寡糖对慢性不可预知温和应激诱导的斑马鱼抑郁样行为及肠道菌群的影响[J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(7): 1025-1034. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.07.012

LONG Y, SHI Y X, QIU Y, et al. Effects of alginate oligosaccharides on depression-like behavior and gut microbiota in zebrafish induced by chronic unpredictable mild stress[J]. Journal of Guangxi medical university, 2024, 41(7): 1025-1034. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.07.012