

氟西汀对糖尿病抑郁模型大鼠肠道菌群代谢多样性的影响

王雪

(黑龙江省中医医院内分泌科 黑龙江哈尔滨 150010)

摘要: 目的探讨氟西汀对糖尿病抑郁模型大鼠肠道菌群结构和代谢多样性的影响。方法将 30 只 SD 大鼠随机分为糖尿病组、糖尿病抑郁模型组、氟西汀组, 采用高脂饲养+腹腔注射链脲佐菌素+慢性不可预知温和应激(cums)联合孤养建立糖尿病抑郁复合模型, 糖尿病组和糖尿病抑郁模型组给予生理盐水灌胃, 氟西汀组给予盐酸氟西汀分散片 $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃, 28d 后提取肠道微生物, 采用 Biolog-ECO 系统和选择性培养分析大鼠肠道菌群结构和代谢变化规律。结果 氟西汀可减少糖尿病抑郁模型组大鼠的抑郁样行为; 氟西汀可显著上调糖尿病抑郁模型大鼠肠道中双歧杆菌和乳酸菌丰度 ($P < 0.01$), 下调脆弱拟杆菌、肠杆菌和产气荚膜梭菌丰度 ($P < 0.01$), 而对肠球菌丰度无明显调节作用。聚类分析和主成分分析显示氟西汀组与糖尿病组、糖尿病抑郁模型组之间存在明显差异。结论氟西汀对糖尿病抑郁模型大鼠肠道菌群结构和代谢多样性具有显著正向调控作用, 与其抗抑郁机制相关。

关键词: 氟西汀; 糖尿病抑郁症; 肠道菌群; 代谢多样性

糖尿病抑郁症是糖尿病的常见并发症之一, 是一种基于情感活动障碍的发作性疾病。研究表明, 超过一半的糖尿病患者伴有不同程度的抑郁症状^[1], 且糖尿病和抑郁症是相互的危险因素, 糖尿病可使抑郁症的发病率增加 20%, 而抑郁症可使糖尿病的发病率提高 60%^[2]。糖尿病抑郁症共病的防治工作已成为社会和医学界亟待解决的问题。目前, SSRI 类仍是临床上应用最广泛的抗抑郁药物, 可用于各种类型的情绪障碍, 不良反应少, 对 NE 影响小。其中氟西汀不仅能改善情绪, 还能减少碳水化合物和热量摄入, 降低血糖, 减轻体重, 从而增强胰岛素敏感性, 改善胰岛素抵抗, 在糖尿病抑郁症的治疗中发挥多重作用^[3]。近年来, 许多研究表明, 肠道-微生物群-脑轴对行为和神经系统的调节至关重要, 宿主肠道微生物群的失衡可导致包括抑郁和焦虑在内的各种精神情感障碍^[4], 而糖尿病抑郁症患者体内的肠道菌群是明显失衡的。因此, 肠道菌群紊乱可能是糖尿病抑郁症发生的关键因素。本研究旨在探讨氟西汀对糖尿病抑郁模型大鼠肠道菌群的影响, 从而阐明其抗抑郁机制。

材料和方法

1 实验动物、试剂和仪器

实验用 SPF 级 SD 雄性大鼠 30 只, 体质量(200 ± 20) g, 饲养于黑龙江省中医药科学院 SPF 级动物实验室, 温度(20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度(55 ± 10)%, 每日 12 h 光/暗周期, 自由摄食饮水。实验动物均购于哈尔滨医科大学实验动物学部, 许可证号 SCXK(黑) 2019-001。盐酸氟西汀分散片购自礼来苏州制药有限公司, 国药准字 J20160029, 规格: $20\text{ mg} \times 28$ 片)。

2 方法

2.1 动物模型的制备与分组

适应性饲养 1 周后, 将 30 只大鼠随机分为糖尿病组($n = 10$)、糖尿病抑郁模型组($n = 10$)、氟西汀组($n = 10$)。动物给予 4 周高糖高脂饲养后分次腹腔注射 $30 \sim 35\text{ mg/kg}$ 链脲佐菌素, 形成糖尿病动物模型^[5]; 后再施加 4 周慢性不可预知性温和应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 形成糖尿病并发抑郁症动物模型^[5]。慢性不可预知温和应激 (CUMS), 包括以下 7 种^[6]: ①电击足底 1 min; ② 4°C 冰水游泳 5 min; ③行为束缚 2h; ④夹尾 1min; ⑤禁食 24h; ⑥禁水 24h; ⑦夜间光照 12h。根据随机法每天定时随机选择 1 种刺激方法。

2.2 模型验证、药物干预、行为学检测

造模 8 周后, 氟西汀组给予盐酸氟西汀分散片 $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃, 糖尿病组和糖尿病抑郁模型组给予 $1.5\text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 生理盐水灌胃。连续灌胃 28d 后, 进行行为学实验评估^[7]。本文采用悬尾实验、强迫游泳实验和旷场实验对动物的抑郁样行为进行评价^[8]。上述实验中均保证同期实验动物之间不可见, 以减少动作干扰。

2.3 粪便收集和处理

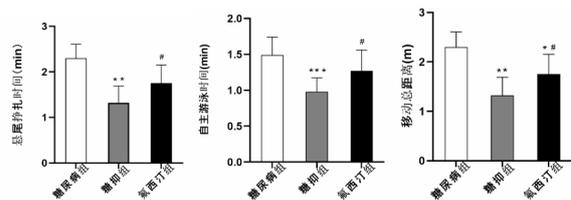
收集大鼠粪便, 称重、混匀、涡旋、离心, 取上清液, 稀释为浓度 $10 \sim 3\text{ g/mL}$ 菌悬液, 培养菌落, 同时接种于 Biolog-ECO 微平板, 在 37°C 恒温厌氧箱培养。运用 Biolog 系统读数测定, 检测碳源代谢过程中颜色和吸光度变化。平均颜色变化率 (AWCD) 表征微生物群落对单一碳源的利用能力和代谢总体活性。聚类分析对微平板中具有相同代谢特征的碳源进行亲疏度判别和重新分类, 比较不同组别大鼠肠道菌群碳源代谢的差异。主成分分析使变量简化降维, 对吸光度相关矩阵进行线性变换, 提取对组间差异贡献大的因子。以上操作均在无菌环境中进行, 保证实验数据的准确性。

3 统计学处理 采用统计软件 SPSS 26.0 进行数据分析。所有数据均以均数 \pm 标准误 ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) 表示。组间均数比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 氟西汀组减少糖抑模型组大鼠的抑郁样行为

与糖尿病组比较, 糖抑组大鼠悬尾挣扎时间、自主游泳时间和旷场内移动总距离显著减少 ($P < 0.01$); 与糖抑组比较, 氟西汀组悬尾挣扎时间、自主游泳时间和移动总距离显著增加 ($P < 0.05$, 图 1)。



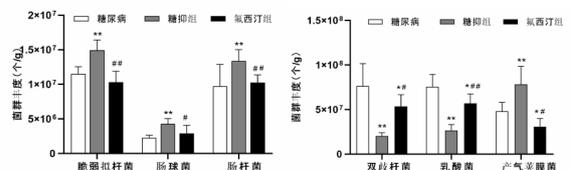
A: 悬尾实验; B: 强迫游泳实验; C: 旷场实验

*与糖尿病组比较, $P < 0.05$; #与糖抑组比较, $P < 0.05$

图 1 大鼠行为学变化

2 大鼠肠道 6 种常见菌属丰度变化

与糖尿病组相比, 糖抑组大鼠肠道内脆弱拟杆菌、肠杆菌和产气荚膜菌数量显著增加 ($P < 0.01$), 双歧杆菌和乳酸菌数量显著减少 ($P < 0.01$), 肠球菌数量增加不明显 ($P < 0.01$); 与糖抑组相比, 氟西汀组大鼠肠道内脆弱拟杆菌、产气荚膜梭菌、肠杆菌数量显著减少 ($P < 0.05$), 双歧杆菌和乳酸菌数量显著增加 ($P < 0.05$)。



*与空白组比较, $P < 0.05$; #与模型组比较, $P < 0.05$

图 2 大鼠肠道 6 种常见菌属丰度变化

3 大鼠 AWCD 值的变化

各组大鼠肠道微生物在厌氧培养 48h 内, 各组 AWCD 值均随培养时间延长而逐渐增加, 表明各组肠道微生物群的总整体体代谢活性随培养时间延长而逐渐增强。培养 48h 后, 糖尿病组和氟西汀组 AWCD 值逐渐趋于平稳; 而糖抑组 AWCD 值逐渐下降, 于 96h 后逐渐趋于平稳。

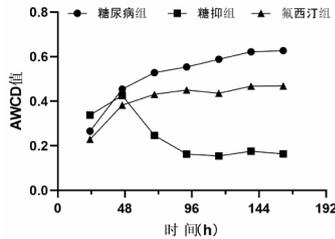


图 3 大鼠 AWCD 值变化

4 大鼠肠道菌群代谢聚类分析

当聚类距离 ≤ 5 时, 糖尿病组碳源被聚为 7 类, 糖抑组和氟西汀组碳源被聚为 5 类。说明较于糖抑组和氟西汀组, 糖尿病组的大鼠肠道微生物对碳源的利用比较分散。糖抑组中 2-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸等酚酸类碳源与苯乙基胺、腐胺等胺类碳源被聚为一类, 这些碳源在其他组中则被聚在不同的类别。氟西汀组糖类碳源和氨基酸类碳源被聚为一类, 2-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸等酚酸类碳源未在该聚类 (图 4)。

5 大鼠肠道菌群代谢主成分分析

主成分分析结果, 糖尿病组、糖抑组、氟西汀组大鼠中成分 1 的方差贡献率分别为 52.553%、84.697%、84.122% (图 5)。

分析载荷图中 3 组大鼠肠道微生物对 31 种碳源的代谢特点, 糖尿病组、糖抑组和氟西汀组中 PC1 在 D-甘露醇、D-纤维二糖、D-木糖等糖类碳源和 L-苏氨酸、L-丝氨酸、L-精氨酸等氨基酸类碳源上均有较高载荷, 说明这两类碳源是大鼠肠道微生物的主要营养物质。与糖尿病组相比, 糖抑组中 PC1 在 2-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸等酚酸类碳源和苯乙基胺等胺类碳源均有较高载荷, 可能糖抑组造模后的主要利用物质增加了胺类。与糖尿病组和糖抑组相比, 氟西汀组增加了肝糖多聚物类碳源, 说明氟西汀能提高大鼠肠道微生物对复杂大分子物质的利用能力, 这与李等^[10]的研究结果一致。

糖尿病组中 PC2 在 D,L- α -甘油、L-丝氨酸、L-苏氨酸、肝糖、葡萄糖-1-磷酸盐、2-羟基苯甲酸、腐胺和 α -丁酮酸等碳源上有较高的载荷, 表明在糖尿病组中这些碳源对 PC2 的贡献率较大。糖抑组中 PC2 在吐温 40 和 1-赤藻糖醇等碳源上有较高的载荷。氟西汀组中 PC2 在 4-羟基苯甲酸和吐温 80 等碳源上有较高的载荷。

D-纤维二糖在糖尿病组中对 PC1 贡献率较大, 葡萄糖-1-磷酸盐、腐胺在糖尿病组中对 PC2 贡献率较大, 而在糖抑组中对 PC1 和 PC2 的贡献率都不大。2-羟基苯甲酸、 α -丁酮酸、L-苏氨酸在糖抑组中对 PC1 贡献率较大, 在糖尿病组对 PC2 贡献率较大, 而其中 α -丁酮酸在氟西汀组中对 PC1 和 PC2 的贡献率都不大。 γ -羟基丁酸、D-半乳糖醛酸在糖尿病组和氟西汀组中对 PC1 贡献率较大, 而在糖抑组中对 PC1 和 PC2 的贡献率都不大。甘氨酸-L-谷氨酸、肝糖在氟西汀组中对 PC1 贡献率较大。

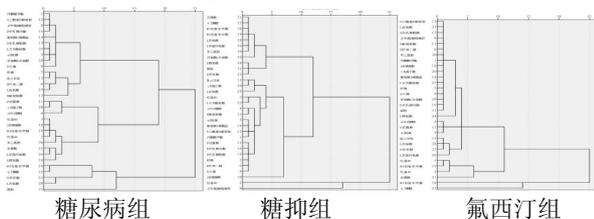


图 4 大鼠肠道菌群代谢聚类分析

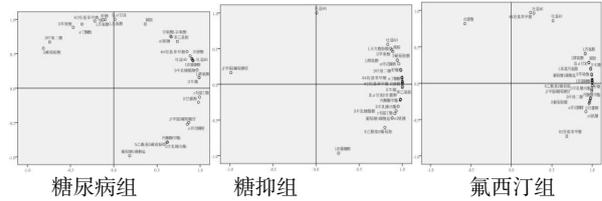


图 5 大鼠肠道菌群代谢主成分分析

讨论

糖尿病与抑郁症的关系是双向的, 两者通过共同的病理机制相互影响, 相互促进^[11]。抑郁症既会增加激素释放、激活免疫炎症, 使得胰岛细胞功能障碍^[12], 又会使人体生物规律失调, 这些都可能诱发糖尿病或加重糖尿病病情进展。作为相互影响因素, 糖尿病也会导致海马细胞凋亡、HPA 轴功能紊乱, 从而使抑郁症状加重或加速抑郁患者的认知能力下降^[13-15]。

糖尿病与抑郁症的共病病因较为复杂, 目前研究认为, 糖尿病与抑郁症共同的发病机制主要包括遗传、先天免疫、氧化应激与炎症的相互作用、单胺类神经递质受损、脑源性神经营养因子 (BDNF) 功能失调以及下丘脑-垂体-肾上腺皮质 (HPA) 轴功能异常、生物节律失调及胰岛素抵抗、肠道菌群失调等方面^[16-19]。健康的肠道微生物群在大脑功能和情绪调节中发挥着作用, 肠道菌群的失衡会导致一些对脑功能至关重要的脂质减少, 甚至消失, 从而出现抑郁行为^[20]。糖尿病抑郁症目前主要的治疗方法是中西医结合的方式, 另外西药中盐酸氟西汀是目前抗抑郁症的首选处方药^[21], 氟西汀可改善神经递质因子水平, 纠正机体内神经递质紊乱状态, 保护脑-肠轴功能, 从而改善患者情感状态^[22]。

本研究结果显示, 经过氟西汀干预的大鼠, 悬尾挣扎时间、自主游泳时间和移动总距离较糖抑组大鼠均显著增加 ($P < 0.05$)。而 Biolog-ECO 结果显示各组大鼠肠道微生物的碳源利用能力和总体代谢活性也发生了显著改变, 糖尿病组 $>$ 氟西汀组 $>$ 糖抑组。其中糖抑组 AWCD 值比糖尿病组、氟西汀组明显低下, 说明糖抑组大鼠微生物群落数量和活性都受到较大影响, 提示糖尿病联合抑郁造模后大鼠肠道菌群可能发生紊乱, 菌群数量及活性显著下降; 氟西汀组的 AWCD 值较糖尿病抑郁模型组升高明显, 提示氟西汀对糖尿病抑郁大鼠肠道菌群具有良性调节作用, 可增加肠道菌群数量及代谢活性。聚类和主成分分析显示, 氟西汀干预后碳源利用相对集中, 且集中在糖类碳源和氨基酸类碳源, 说明氟西汀可能通过增加糖酵解, 加快能量消耗, 来调节肠道微生物改变, 从而在减轻抑郁行为的同时, 也改善糖尿病抑郁患者的血糖水平。因此, 氟西汀减少糖尿病并发抑郁大鼠的抑郁样行为与其正向调控肠道菌群密切相关。

综上所述, SSRI 类抗抑郁药氟西汀可通过下调脆弱拟杆菌、产气荚膜菌等有害菌属丰度, 同时上调双歧杆菌等有益菌属丰度, 改善肠道内异常菌群分布, 来达到抗抑郁效果的。因此, 恢复肠道健康微生物群来有效地治疗情感活动障碍, 将有望成为未来研究新方向。

参考文献:

[1]Florek-Luszczki M, Choina P, Koszewska-Zabłocka E, Panasiuk L, Dziemidok P. Medical and socio-demographic determinants of depressive disorders in diabetic patients. Ann Agric Environ Med. 2020 Jun 19;27(2):255-259. doi: 10.26444/aaem/118529. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32588602.
 [2]SUBBA R, SANDHIR R, SINGH S P, et al.Pathophysiology linking depression and type 2diabetes: psychotherapy, physical exercise, and fecalmicrobiome transplantation as damage control [J]. EurJ Neurosci, 2021, 53 (8) : 2870-2900.

(上接第 83 页)

- [3]蔡萧君,王磊.糖尿病合并抑郁的中西医研究进展[J].黑龙江中医药,2018,47(1):6.
- [4]Nanthakumaran S,Sridharan S,Somagutta MR et al.肠脑轴及其在抑郁症中的作用[J].居然,2020,12(9):e10280
- [5]张秋林,林慧婷,周格,等.链脲佐菌素腹腔注射制作大鼠 2 型糖尿病模型的方式与剂量研究[J].按摩与康复医学,2023,14(2):4.
- [6]杨蕙,刘检,唐林,等.左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马胰岛素抵抗的影响[J].中草药,2020,51(11):3013-3020.
- [7]ZHANG S S, TIAN Y H, JIN S J, et al. Isoflurane produces antidepressant effects inducing BDNF-TrkB signaling in CUMS mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2019, 236(11): 3301-3315.
- [8]PARK B K, KIM N S, KIM Y R, et al. Antidepressant and anti-neuroinflammatory effects of BangpungtongsungSan [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 958.
- [9]杨蕙,王宇红,杜青,等.左归降糖解郁方通过调控 SIRT1/TORC1 通路增加糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经元树突棘密度[J].中国病理生理杂志,2021,37(3):400-407. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2021.03.003.
- [10]李宇,蔡萧君,陆振华,颜彦鹏,王涛,王钦,吴圆圆.氟西汀对抑郁模型大鼠肠道菌群代谢多样性的影响[J].胃肠病学,2021,26(06):342-347.
- [11]崔涛.抑郁症伴发糖尿病的护理对生活质量的影响.糖尿病新世界,2020,23(10):161-162,165.
- [12]李仁实,华梦羽,庄向华,等.糖尿病合并抑郁发病机制的研究进展[J].医学信息,2022,35(23):166-170.
- [13]田之魁,王东军,关媛媛,等.中医分时辨治与盐酸氟西汀比较治疗糖尿病合并抑郁症的 Meta 分析[J].世界科学技术-中医药现代化,2021(011):023.
- [14]Costa M V,de Paula J J,Ávila R,et al.Association of depression and diabetes mellitus with processing speed,inhibitory control and cognitive flexibility in older adults with mild cognitive impairment.*Alzheimer's Dement*,2020,16(6):e043892.
- [15]中华医学会糖尿病学分会.中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版).*中国糖尿病杂志*,2014,22(8):2-42.
- [16]CHAMPANERI S, WAND G S, MALHOTRA S S, et al. Biological basis of depression in adults with diabetes [J]. *Curr Diab Rep*, 2010, 10(6): 396-405.
- [17]STRINE T W, MOKDAD A H, DUBE S R, et al. The association of depression and anxiety with obesity and unhealthy behaviors among community-dwelling US adults [J]. *Gen Hosp Psychiatry*, 2008, 30(2): 127-137.
- [18]CHIODINI I, DI L S, MORELLI V, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in type 2 diabetes mellitus: role of autonomic imbalance [J]. *Metabolism*, 2006, 55(8): 1135-1140.
- [19]YI S S, HWANG I K, SHIN J H, et al. Regulatory mechanism of hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and neuronal changes after adrenalectomy in type 2 diabetes [J]. *J Chem Neuroanat*, 2010, 40(2): 130-139.
- [20]Chevalier G, Siopi E, Guenin-Mace L, et al. The impact of gut microbiota on depressive-like behaviors and adult hippocampal neurogenesis requires the endocannabinoid system. 2019.
- [21]BARAKAT A, HAMDY M M, ELBADR M M. Uses of fluoxetine in nociceptive pain management: A literature overview [J]. *Eur Pharmacol*, 2018, 829: 12-25.
- [22]王自启,张鑫.氟西汀联合双歧三联活菌对 Hp 阳性 CAG 伴焦虑抑郁患者心理状态、炎症因子水平及肠道菌群的影响[J].国际精神病学杂志,2021,48(04):715-717+722.