

· 论 著 ·

菊淀粉型巴戟天寡糖对慢性应激模型小鼠抑郁、焦虑样行为的改善及对调节性 T 细胞数量的调节作用

王 轶¹, 郭婷婷², 尹勇玉¹, 张黎明¹, 张纪岩², 李云峰^{1,2}(军事科学院军事医学研究院 1. 毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室,
2. 军事认知与脑科学研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 评价抗抑郁药菊淀粉型巴戟天寡糖(IOMO)对慢性不可预知应激(CUS)模型小鼠抑郁、焦虑样行为的影响,并探究其对 CUS 模型小鼠小肠上皮和脾组织中调节性 T 细胞(Tr 细胞)的调节作用。方法 连续 28 d 给予小鼠 CUS 建立抑郁模型。实验分为正常对照组、CUS 模型组、CUS+氟西汀(FLX)组和 CUS+IOMO 组。于应激首日开始每天 1 次 ig 给予 IOMO 50 mg·kg⁻¹或 FLX 10 mg·kg⁻¹,连续给药 28 d。在 CUS 造模前和结束时,采用蔗糖偏嗜实验(SPT)各检测 1 次小鼠蔗糖偏嗜度。CUS 造模后,以开场实验(OFT)评价焦虑样行为;以强迫游泳实验(FST)和新奇抑制摄食实验(NSF)评价抑郁样行为;采用流式细胞术检测小鼠小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数量。结果 慢性应激 28 d 后,与正常对照组相比,CUS 模型组小鼠在 SPT 中蔗糖偏嗜度显著降低($P<0.01$);在 OFT 中进入中央区的累计次数和累计停留时间显著减少($P<0.05$),表现出焦虑样行为;在 FST 中不动时间显著延长($P<0.05$),在 NSF 中摄食潜伏期显著延长($P<0.01$),表现出抑郁样行为;小鼠小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数量显著减少($P<0.05$)。与 CUS 模型组相比,CUS+IOMO 组和 CUS+FLX 组小鼠抑郁样和焦虑样行为显著缓解,小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数量显著增加($P<0.05$)。相关性分析显示,小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数目变化与蔗糖偏嗜度变化之间具有显著相关性(Pearson 相关系数 r 分别为 0.5044 和 0.7267, $P<0.05$)。结论 在 CUS 模型小鼠上,IOMO 在表现出抗抑郁、抗焦虑作用的同时可增加小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞的数目,这可能是其抗抑郁作用机制之一。

关键词: 抑郁症;菊淀粉型巴戟天寡糖;慢性不可预知应激;调节性 T 细胞

中图分类号:R964

文献标志码:A

文章编号:1000-3002-(2022)06-0426-09

DOI:10.3867/j.issn.1000-3002.2022.06.004

抑郁症是以情绪低落、兴趣减退、绝望无助并伴随认知功能受损、睡眠或食欲紊乱等为特征的综合征。据世界卫生组织 2019 年调查报告显示,抑郁症是患病率最高的精神疾病,是世界范围内致残的主要原因^[1-2]。目前临床一线抗抑郁药物主要为选择性 5-羟色胺重摄取抑制和 5-羟色胺和去甲肾上腺素双重重摄取抑制剂等,但这些药物仅对约 1/3 患者有效,起效通常存在 2~3 周延迟,且常伴有认知损害等不良反应^[3]。

研究发现,一些中药提取物具有抗抑郁作用,如刺五加苷、金丝桃素和灵芝多糖等^[4]。巴戟天为

茜草科植物巴戟天(*Morinda officinalis* How.)的干燥根,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿功效。本实验室前期研究发现巴戟天具有抗抑郁作用^[5],从中提取出水溶性菊淀粉型低聚寡糖——菊淀粉型巴戟天寡糖(inulin-type oligosaccharides of *M. officinalis*, IOMO),并证实其为巴戟天抗抑郁作用的主要活性部位^[6]。进一步研究表明,IOMO 兼具增强免疫^[7]和调节睡眠^[8]等作用。IOMO 结构上属于益生元^[9],即一类可在体内产生有益作用,但不能被机体直接消化吸收的物质,其抗抑郁具体机制至今不明。研究发现,IOMO 具有改善神经营养和保护神经细胞的作用^[10],口服生物利用度低,需要经肠道菌群快速降解,且其水解规律较复杂^[11]。IOMO 的抗抑郁作用可能是其与肠道菌群相互作用的结果,即依赖于菌群-肠-脑轴^[9,12]。神经、免疫和体液三大途径是肠-脑间进行信息沟通的主要通路^[13]。巴戟天在中医上的强筋骨、祛风湿功效,以及 IOMO 增强免

基金项目:国家自然科学基金(81773708);国家自然科学基金(81173036)

作者简介:王 轶,硕士研究生,主要从事神经精神药理学研究,E-mail:YiWi0421ang@outlook.com

通讯作者:张纪岩,E-mail:jiyanzhang@hotmail.com;李云峰,E-mail:lyf619@aliyun.com

疫的作用都提示 IOMO 可能通过调节机体免疫发挥抗抑郁作用。

近年来,抑郁症与免疫系统功能紊乱之间的关系备受关注,大多数研究主要针对免疫细胞和细胞因子在抑郁症发病和治疗过程中的作用^[14]。抑郁症患者血脑屏障通透性增加^[15],外周免疫细胞可进入中枢,对中枢神经系统产生重要影响。其中,抑郁症患者外周调节性 T(regulatory T, Tr)细胞可能通过下调慢性炎症反应在抑郁症中发挥神经保护作用^[16]。研究表明,小鼠全身性耗竭 Tr 细胞后可表现出抑郁样行为^[17],尾静脉注射给予少量 Tr 细胞刺激剂可改善抑郁样行为^[18],因此,Tr 细胞可能成为新的抑郁症治疗靶点^[19]。肠道和脾是 2 个重要的免疫器官,菌群-肠-脑轴和脑-脾轴与中枢神经系统和外周免疫系统之间的联系有关,抗抑郁药物可通过靶向肠道和脾的免疫细胞(如 Tr 细胞)调节机体免疫系统功能,进而改善神经炎症,以发挥抗抑郁作用^[4]。

本研究拟采用小鼠慢性不可预知应激(chronic unpredictable stress, CUS)模型,以选择性 5-羟色氨重摄取抑制剂氟西汀(fluxetine, FLX)作为阳性对照药。探究 IOMO 在发挥抗抑郁作用的同时,对 CUS 模型小鼠小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞的调节作用,并探索 Tr 细胞数目与抑郁样行为的相关性,旨在为探索抗抑郁药物的新靶点和新机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂和仪器

IOMO 原料药(批号:20210501),北京同仁堂股份有限公司提供,主要制备过程:巴戟天经水提、活性炭吸附、水洗,乙醇洗脱、浓缩、喷雾干燥得到 IOMO 成分稳定可靠,经化学及波谱学鉴定^[20],IOMO 原料药中 3~9 聚寡糖含量 53%~70%,其中 5 聚糖含量 $\geq 6\%$ 。FLX 原料药(批号:H1929183,纯度 $>98\%$),上海阿拉丁生化科技股份有限公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),天津康源生物公司;DTT、RPMI-1640 培养基、HEPPS 和 HBSS 缓冲液,美国 Gibco 公司;Permeabilization 透化液、Fixation/Perm Diluent 固定液和计数微球,美国 eBio-science 公司;Percoll 分离液,美国 GE 公司;Percp-抗 CD45、FITC-抗 CD4、APC-抗 CD25 和 PE-抗 Foxp3,美国 Bio-legend 公司。电子分析天平,德国 Sartorius 公司;小鼠开场实验箱及小鼠强迫游泳实验观察箱,深圳市瑞沃德生命科技有限公司;BD

FACSAria II 型流式细胞仪,美国 BD 公司。

1.2 实验动物

SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 20~24 g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0002。每笼 5 只饲养,饲养环境温度 20~24℃,湿度 40%~60%,光照时间 8:00~20:00,动物自由摄食饮水,适应性饲养 7 d 后开始实验。本研究经军事医学研究院实验动物伦理委员会批准,符合伦理学以及动物福利要求,实验动物伦理批准号:IACUC-DWZX-2022-523。

1.3 小鼠 CUS 模型建立

小鼠测定基础蔗糖偏嗜度(详见 1.4.1)后,按蔗糖偏嗜度均衡分为 4 组:正常对照组、CUS 模型组、CUS+FLX 10 mg·kg⁻¹组和 CUS+IOMO 50 mg·kg⁻¹组,每组 12 只。除正常对照组外,其余组连续 28 d 每天 2 或 3 种随机给予以下刺激:夹尾 1 min、禁食 12 h、禁水 12 h、45℃倾斜饲养 12 h、通宵照明 12 h、潮湿饲养 12 h、频闪(100 min⁻¹)加白噪声(110 dB)2 h、强迫游泳(水温 15℃)5 min、束缚 2 h,应激程序符合不可预测性的特点,并于应激当天(第 0 天)开始 ig 给药,每天 1 次,连续给药 28 d。实验流程见图 1。

1.4 行为学评价

1.4.1 蔗糖偏嗜实验(sucrose preference test, SPT)

小鼠适应性饲养后进行训练:单笼饲养,同时给予 2 个装有 1% 蔗糖水的饮水瓶饲养 24 h,再同时给予 2 个装有纯净水的饮水瓶饲养 24 h。训练后正常饲养 24 h,再次禁水 24 h,然后进行蔗糖偏嗜度测定:同时给予小鼠 1% 蔗糖水和纯净水各 1 瓶,检测 12 h 内蔗糖水和纯净水的饮用量(g),计算蔗糖偏嗜度。蔗糖偏嗜度(%)=蔗糖水饮用量/(蔗糖水饮用量+纯净水饮用量) $\times 100\%$ 。初次测量的基础蔗糖偏嗜度作为小鼠均衡分组的依据。于应激第 28 天再次测定蔗糖偏嗜度,反映小鼠抑郁样行为。

1.4.2 开场实验(open field test, OFT)

于应激第 29 天进行 OFT。小鼠置实验箱(60 cm $\times$ 60 cm $\times$ 16 cm,底部等分为 16 小格)的角落,自由活动 5 min,记录小鼠跨格数(四肢全部跨进同一格子)和运动总距离,以反映小鼠的自发活动。同时记录 5 min 内小鼠进入中央区(中间 4 格)的累计时间和次数,以反映小鼠的焦虑样行为。

1.4.3 强迫游泳实验(forced swimming test, FST)

于应激第 30 天进行 FST。将小鼠置高 20 cm、直径 12 cm、水深 10 cm 的圆形玻璃容器中,水温

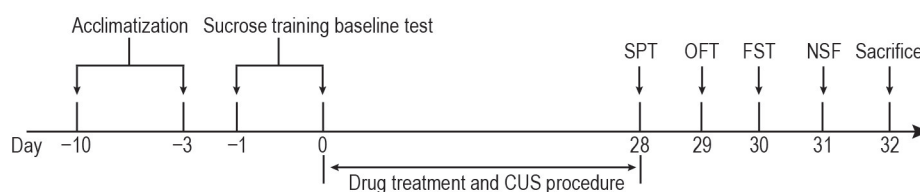


Fig.1 Schedule of treatment and behavioral tests for chronic unpredictable stress (CUS) model in mice. Except for the normal control group, the depression model was prepared by giving CUS stimuli to the remaining groups for 28 consecutive days. Mice were ig given fluoxetine (FLX, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), inulin-type oligosaccharides of *M.officinalis* (IOMO, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) or water (control and CUS model groups) from the first day of the CUS procedure once per day for 28 d. SPT: sucrose preference test; OFT: open field test; FST: forced swimming test; NSF: novel inhibition feeding test.

25°C , 观察 6 min, 记录后 4 min 的累计不动时间。判定不动的标准是动物在水中停止挣扎, 呈漂浮状态, 仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面。

1.4.4 新奇抑制摄食实验 (novel inhibition feeding test, NSF)

于应激第 31 天进行 NSF。于安静、强光且陌生的环境下, 将小鼠置陌生的实验箱一角, 箱内底部铺 2 cm 厚的锯末, 中央摆放 6 个同样大小的食丸。放入小鼠的同时开始计时, 记录 5 min 内开始摄食的潜伏期。摄食的判定标准是动物开始发出啃咬食物的声音, 而不是仅仅嗅闻或摆弄食物。摄食潜伏期可作为评价慢性应激模型小鼠抑郁样行为的指标^[21]。

1.5 流式细胞术检测小鼠小肠上皮和脾淋巴细胞中 Tr 细胞的百分比和数目

1.5.1 小肠上皮和脾淋巴细胞悬液的制备

于应激第 32 天处死小鼠后取小肠和脾。将小肠在保持湿润条件下去除脂肪和淋巴结, 在含 5% FBS 和 HEPES $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RPMI 洗涤溶液中剖开肠道去除内容物, 剪成约 1 cm 的小段浸入含 10% FBS, DTT $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 HEPES $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RPMI 消化缓冲液中, 在 37°C 振荡 20 min。冰上将消化液用 $70 \mu\text{m}$ 筛网过滤, 消化碎片转移到含 10% FBS, EDTA $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 HEPES $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RPMI 的消化缓冲液中, 在 37°C 振荡 30 min 后再次过滤。将 2 次过筛后的上清汇合混匀, 加入用 PMI-1640 培养基稀释至 44% 的 Percoll 分离液, 于 24°C 、 $400 \times g$ 离心 20 min 得到小肠上皮淋巴细胞悬液。将脾放入 $100 \mu\text{m}$ 滤网中, 于预冷的 FACS 缓冲液 (每 50 mL 1xPBS 缓冲液含有 1 mL FBS) 中挤压, 制备脾淋巴细胞悬液。

1.5.2 Tr 细胞百分比检测

采用细胞膜表面标志物 CD4 和 CD25 及核内标志物 Foxp3 共染标记 Tr 细胞。每只小鼠取 1×10^6 1.5.1 制备的细胞, 先加入 Percp-抗 CD45, FITC-抗

CD4 和 APC-抗 CD25 抗体各 $1 \mu\text{L}$, 进行细胞膜表面染色 30 min, 再加入 Fixation/Perm Diluent 固定液固定过夜, 用 Permeabilization 透化液洗涤和透膜后加 PE-抗 Foxp3 抗体 $1 \mu\text{L}$, 进行细胞核内染色 60 min; 用 Permeabilization 透化液洗涤、固定后 4°C 保存, 而后用流式细胞仪进行分析。各组均设抗体单标管及阴性对照管, 细胞检测数为 1×10^5 , 用 FlowJo 软件分析 Tr 细胞在 CD4^+ 细胞中的百分比及 CD4^+ 细胞在 CD45^+ 细胞中的百分比。

1.5.3 Tr 细胞数目检测

每只小鼠取 1.5.1 制备的单细胞悬液 $50 \mu\text{L}$, 加入 $200 \mu\text{L}$ 计数微球混合液 (含有 $20 \mu\text{L}$ 计数微球原液、 $0.1 \mu\text{L}$ FITC-抗 CD45 抗体和 $180 \mu\text{L}$ FACS 缓冲液) 混匀, 30 min 后用流式细胞仪检测 CD45^+ 细胞比例, 并计算 CD45^+ 细胞总数。 CD45^+ 细胞总数 = (CD45^+ 细胞比例 / 微球比例) $\times$ (每管微球数 / 样品体积); Tr 细胞数目可通过 CD45^+ 细胞总数及 1.5.2 分析得到的 CD4^+ 细胞在 CD45^+ 细胞中的百分比和 Tr 细胞在 CD4^+ 细胞中的百分比 3 项数值相乘得出。

1.6 统计学分析

实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad-Prism 8.0.1 进行数据分析和绘图。小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数目与抑郁样行为间的相关性分析采用双因素 Pearson 线性相关法; 其他数据采用单因素方差分析和 Dunnett t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IOMO 对 CUS 模型小鼠蔗糖偏嗜度的影响

实验结果 (图 2) 显示, 应激前各组小鼠蔗糖偏嗜度无明显差异。应激第 28 天, 与正常对照组相比, CUS 模型组小鼠蔗糖偏嗜度显著降低 ($P < 0.01$), 表现出抑郁样行为 (快感缺失); 与 CUS 模型组相比, CUS+FLX $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和 CUS+IOMO $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

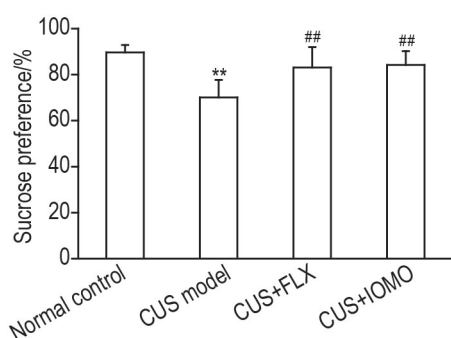


Fig.2 Effect of IOMO on sucrose preference in SPT in CUS mice. See Fig.1 for the mouse treatment. On the 28th day of the CUS procedure, the preference for sucrose was detected. $\bar{x} \pm s$, $n=12$. ** $P<0.01$, compared with normal control group; ## $P<0.01$, compared with CUS model group.

组小鼠蔗糖偏好度均显著升高 ($P<0.01$)。提示 IOMO 可改善 CUS 导致的小鼠抑郁样行为。

2.2 IOMO 对 CUS 模型小鼠开场行为的影响

OFT 结果表明 (图 3), 各组小鼠跨格次数和运动总距离均无显著性差异 (图 3A), 提示 IOMO 对

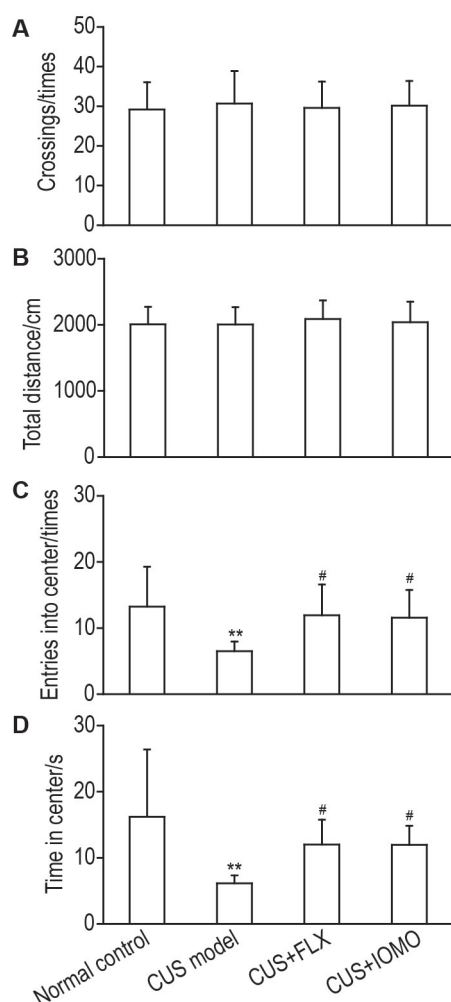


Fig.3 Effect of IOMO on locomotor activity (A and B) and anxiety-like behaviors (C and D) in OFT in CUS model mice. See Fig.1 for the mouse treatment. On the 29st day, the OFT was performed. $\bar{x} \pm s$, $n=12$. ** $P<0.01$, compared with normal control group; # $P<0.05$, compared with CUS model group.

CUS 模型小鼠自发活动无影响。同时,与正常对照组相比,CUS 模型组小鼠进入中央区的次数 ($P<0.01$)以及在中央区停留时间 ($P<0.01$)显著减少。与 CUS 模型组相比,CUS+FLX 组和 CUS+IOMO 小鼠进入中央区次数和累计时间均显著增加 ($P<0.05$)。提示 IOMO 对 CUS 引起的小鼠焦虑样行为具有改善作用。

2.3 IOMO 对 CUS 模型小鼠强迫游泳和新奇抑制摄食行为的影响

FST 和 NSF 实验结果 (图 4) 显示,与正常对照组相比,CUS 模型组小鼠强迫游泳不动时间和新奇环境摄食潜伏期均显著延长 ($P<0.01$)。与 CUS 模型组相比,CUS+FLX 组和 CUS+IOMO 组小鼠强迫游泳不动时间 ($P<0.05$)和新奇环境摄食潜伏期 ($P<0.01$)均显著缩短。提示在 FST 和 NSF 实验中,IOMO 对 CUS 小鼠抑郁样行为具有改善作用。

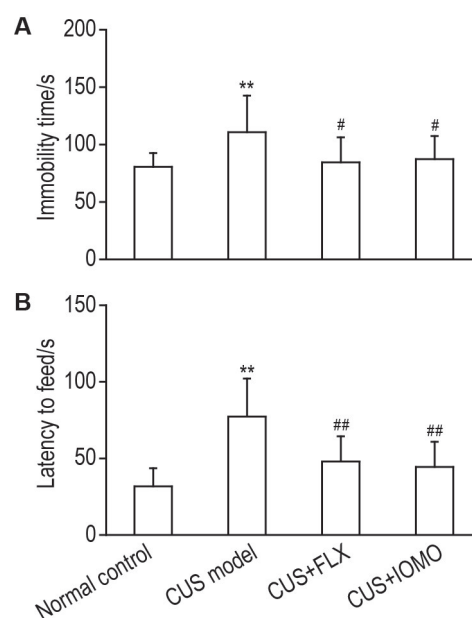


Fig.4 Effect of IOMO on depression-like behavior in FST (A) and NSF (B) in CUS model mice. See Fig.1 for the mouse treatment. On the 30nd and 32th day, the immobility time in FST and the latency to feed in NSF were recorded. $\bar{x} \pm s$, $n=12$. ** $P<0.01$, compared with normal control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with CUS model group.

2.4 IOMO 对 CUS 模型小鼠小肠上皮 Tr 细胞数目的影响

流式细胞术检测结果显示,各组小鼠小肠上皮 Tr 细胞占总 CD4⁺T 细胞比例无显著性差异 (图 5A 和 5B)。与正常对照组相比,CUS 模型组小鼠小肠上皮 Tr 细胞数目显著减少 ($P<0.05$);与 CUS 模型组相比,CUS+FLX 组小鼠小肠上皮 Tr 细胞数目显著增多 ($P<0.05$)。同样,CUS+IOMO 组小肠上皮 Tr 细胞数目也显著增多 ($P<0.05$) (图 5C)。

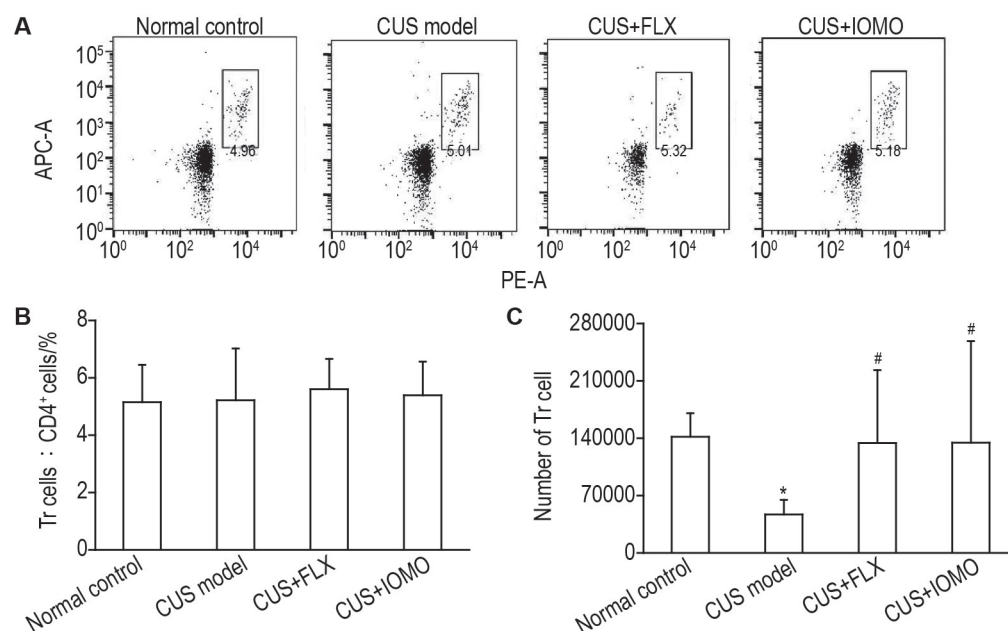


Fig.5 Effect of IOMO on proportion (B) and number (C) of regulatory T (Tr) cells in intestinal epithelial lymphocytes of CUS model mice by flowcytometry. See Fig.1 for the mouse treatment. B was the quantitative analysis results of A. The number of Tr cells was calculated by multiplying the total number of CD4⁺ cells, the percentage of CD4⁺T cells in CD4⁺ cells and the percentage of Tr cells in CD4⁺T cells. $\bar{x} \pm s$, $n=10$. * $P<0.05$, compared with normal control group; # $P<0.05$, compared with CUS model group.

2.5 IOMO 对 CUS 模型小鼠脾组织中 Tr 细胞数目的影响

流式细胞术检测结果显示,各组小鼠脾组织中 Tr 细胞占总 CD4⁺T 细胞百分比无显著性差异(图 6A 和 6B)。与正常对照组相比,CUS 模型组小鼠脾组织中 Tr 细胞数目显著减少($P<0.05$)。与 CUS 模

型组相比,CUS+FLX 组和 CUS+IOMO 组小鼠脾组织中 Tr 细胞数目显著增多($P<0.05$)(图 6C)。

2.6 Tr 细胞数目与蔗糖偏嗜度的相关性

按照文献[22–23]方法评估 Tr 细胞数目与抑郁样行为(蔗糖偏嗜度)之间的相关性发现,小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数目与蔗糖偏嗜度均呈正相

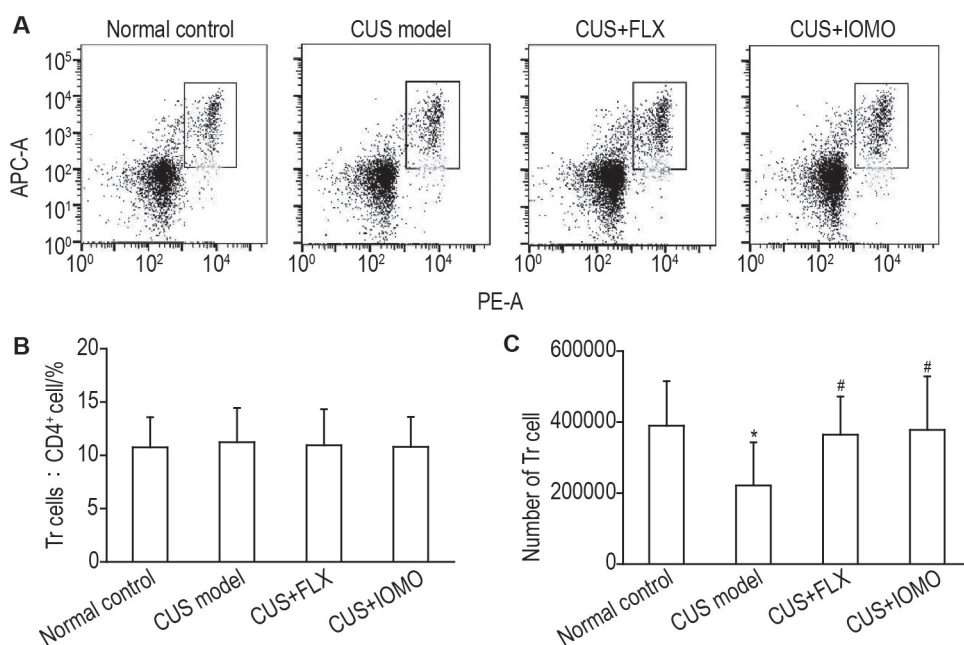


Fig.6 Effect of IOMO on Tr cells in spleens of CUS model mice by flowcytometry. See Fig.1 for the mouse treatment. B and C were the quantitative analysis results of A. $\bar{x} \pm s$, $n=10$. * $P<0.05$, compared with normal control group; # $P<0.05$, compared with CUS model group.

关, Pearson 相关系数 r 分别为 0.5044 和 0.7267 ($P < 0.05$)。提示小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数目变化与小鼠抑郁样行为变化显著相关。

3 讨论

本研究结果显示, IOMO 可在改善 CUS 模型小鼠焦虑和抑郁样行为的同时显著增加小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数量, 且 Tr 细胞数量与抑郁样行为变化程度之间具有显著相关性。

T 细胞作为免疫系统的重要组成部分, 在机体适应性免疫应答中发挥重要作用。免疫调控使得 T 细胞分化为不同的亚群, 以实现多样的免疫应答模式。根据 T 细胞膜表面标志物的不同, 可分为 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞, 前者又可分化为 Th1, Th2, Th17 和 Tr 细胞等。T 细胞的发育和分化失衡与抑郁症病因学密切相关, 如抑郁症患者血液循环内 T 细胞凋亡增加^[24]、CD4⁺/CD8⁺ 比值降低^[25]以及 Th1/Th2 比值显著升高^[26]等。Tr 细胞是 CD4⁺T 细胞的重要亚群之一, 近年来的研究越来越关注 Tr 细胞分化失衡与抑郁症的关系。研究表明, Tr 细胞分化失衡引起了包括中枢小胶质细胞在内的全身巨噬细胞的激活, 引发炎症细胞因子的过度分泌, 诱发神经炎症, 这可能是其诱发抑郁的机制之一^[27]。

文献报道, CUS 模型小鼠体内 Tr 细胞水平显著下降, 在全身性耗竭 Tr 细胞后, 模型小鼠表现出抑郁样行为^[18], 这与本研究结果一致。临床相关研究也表明, 抑郁症患者外周血 Tr 细胞水平显著下降^[17]。近期研究显示, 部分新型冠状病毒肺炎患者治愈后表现出焦虑、抑郁症状, 其外周血内 Tr 细胞水平亦显著下降^[28]。本课题组前期研究表明, 在大鼠获得性无助抑郁模型上, IOMO 50 mg·kg⁻¹ 具有抗抑郁效应^[5]。本研究结果发现, IOMO 在该剂量下显著增加 CUS 模型小鼠小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数量, 提示增加小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞可能是其抗抑郁作用的机制之一。

小肠上皮淋巴细胞是散在分布在肠道上皮细胞之间的免疫细胞, 能直接接触肠道菌群及其代谢产物。由于 IOMO 须经肠道菌群代谢, 因此与之直接接触的小肠上皮淋巴细胞更早受到 IOMO 及其代谢产物的影响。本研究结果表明, IOMO 可改善 CUS 模型小鼠小肠上皮 Tr 细胞数目的减少, 提示 IOMO 及其肠道菌群代谢产物可能改善了 CUS 引起的 Tr 细胞减少。作者所在团队前期研究发现, IOMO 可增加小鼠肠道内容物短链脂肪酸 (short

chain fatty acids, SCFA) 产量 (待发表)。同时相关研究表明, SCFA 可显著促进初始 CD4⁺T 细胞向 Tr 细胞的分化^[29], 提示 IOMO 增加 Tr 细胞数目可能与其代谢产物 SCFA 促进 Tr 细胞产生有关。另有研究显示, 抑郁症患者及抑郁模型动物血液循环的 Tr 细胞水平显著降低, 慢性社交挫败小鼠肠道淋巴结内 Tr 细胞显著下降^[30], 益生元和益生菌共同作用可在改善小鼠抑郁样行为的同时增加小鼠回肠固有层中 Tr 细胞的水平^[31], 其机制与肠道某些固有淋巴细胞亚群有关^[32]。

本研究发现, IOMO 可改善 CUS 模型小鼠脾组织中 Tr 细胞数目的减少, 提示 IOMO 代谢产物进入血液循环后不但可作用于直接接触的小肠上皮淋巴细胞, 还可作用于全身性器官。文献报道, 社交挫败抑郁模型小鼠脾 Tr 细胞水平显著下降, 抑郁易感小鼠 Tr 细胞分化受到抑制^[33], 与本研究结果一致, 提示 Tr 细胞分化失衡可能是抑郁症发病的重要机制。

本研究进一步发现, 小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数目与蔗糖偏嗜度呈显著正相关, 表明小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数目与抑郁样行为显著相关, 提示增加小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数量可能是 IOMO 抗抑郁作用机制之一。

前期研究已证实, ig 给予 IOMO 25~50 mg·kg⁻¹ 具有明确的抗抑郁效应^[34-35], 因此本研究采用 50 mg·kg⁻¹ 剂量, 阳性药 FLX 也同样采用文献报道的小鼠模型评价抗抑郁效应的有效剂量 10 mg·kg⁻¹^[36]。需要注意的是, 本研究采用了伴随给药方式探讨 IOMO 治疗作用, 其主要原因一是 CUS 模型耗时较长, 伴随给药可适当缩短研究周期, 二是抗抑郁药物通常存在约 2 周的起效延迟期, 使得伴随给药成为研究抗抑郁药物治疗效果的常用给药方式。

综上, 在小鼠 CUS 抑郁模型中, IOMO 对焦虑样和抑郁样行为具有改善作用, 并可调节小肠上皮淋巴细胞和脾组织中 Tr 细胞的数量, 且小肠上皮和脾组织中 Tr 细胞数目变化和和行为变化之间具有显著相关性。本研究为天然来源的抗抑郁药物对免疫系统的影响提供了新的实验依据, 其具体调节机制有待深入研究。

参考文献:

- [1] Vos T, Abajobir AA, Abate KH, *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195

- countries, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet*, 2020, 390(10100): 1211–1259.
- [2] Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, *et al.* Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys [J]. *Lancet*, 2020, 370(9590): 851–858.
- [3] Harmer CJ, Duman RS, Cowen PJ. How do antidepressants work? New perspectives for refining future treatment approaches [J]. *Lancet Psychiatry*, 2017, 4(5): 409–418.
- [4] Mok SW, Wong VK, Long HH, *et al.* Natural products-based pharmacological modulation of the peripheral immune system for the treatment of neuropsychiatric disorders [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 208(107): 468–480.
- [5] 张中启, 黄士杰, 袁莉, 等. 巴戟天寡糖对鼠强迫性游泳和获得性无助抑郁模型的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志(*Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*), 2001, 15(4): 262–265.
- [6] 崔承彬, 杨明, 姚志伟, 等. 中药巴戟天中抗抑郁活性成分的研究[J]. 中国中药杂志(*Chinese Journal of Chinese Materia Medica*), 1995, 20(1): 36–38.
- [7] 徐超斗, 张永祥, 杨明, 等. 巴戟天寡糖的促免疫活性作用[J]. 解放军药学报(*Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army*), 2003, 19(6): 466–468.
- [8] 孔庆梅, 舒良, 张鸿燕, 等. 巴戟天寡糖胶囊治疗抑郁症的临床疗效与安全性[J]. 中国临床药理学杂志(*the Chinese Journal of Clinical Pharmacology*), 2011, 27(3): 170–173.
- [9] Chi L, Khan I, Lin Z, *et al.* Fructo-oligosaccharides from *Morinda officinalis* remodeled gut microbiota and alleviated depression features in a stress rat model [J]. *Phytomedicine*, 2020, 67: 153–157.
- [10] 李云峰, 杨明, 姚志伟, 等. 巴戟天寡糖对皮质酮损伤的 PC12 细胞的保护作用[J]. 中国中药杂志(*China Journal of Chinese Materia Medica*) 2000, 9(25): 78–79.
- [11] Chi L, Chen L, Zhang J, *et al.* Development and application of bio-sample quantification to evaluate pharmacokinetics of inulin-type fructo-oligosaccharides from *Morinda officinalis* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 156: 125–132.
- [12] Chen D, Yang X, Yang J, *et al.* Prebiotic effect of fructi oligosaccharides from *Morinda officinalis* on Alzheimer's disease in rodent models by targeting the microbiota-gut-brain axis [J / OL]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 412 (2017-12-08) [2022-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29962999/>. DOI: 10.3389/fneur.2018.00412.
- [13] Foster JA, Baker GB, Dusun SM. The relationship between the gut microbiome-immune system-brain axis and major depressive disorder [J / OL]. *Front Neurol*, 2021, 12: 721126 (2021-09-28) [2022-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34650506/>. DOI:10.3389/fneur.2021.721126.
- [14] Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression [J]. *Trends Immunol*, 2006, 27(1): 24–31.
- [15] Welton MO. Cellular mechanisms and molecular signaling pathways in stress-induced anxiety, depression, and blood-brain barrier inflammation and leakage [J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28(3): 643–665.
- [16] Miller AH. Depression and immunity: a role for T cells? [J]. *Brain Behav Immun*, 2010, 24(1): 1–8.
- [17] Kim SJ, Lee H, Lee G, *et al.* CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell depletion modulates anxiety and depression-like behaviors in mice [J / OL]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e42054 (2012-07-31) [2022-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22860054/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0042054.
- [18] Ellul P, Mariotti-Ferrandiz E, Leboyer M, *et al.* Regulatory T cells as supporters of psycho-immune resilience: toward immunotherapy of major depressive disorder [J / OL]. *Front Neurol*, 2018, 9 (2018-03-20) [2022-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29615964/>. DOI: 10.3389/fneur.2018.00167.
- [19] Corsiuzell F, Deakin B, Decima MHF, *et al.* T regulatory cells as a potential therapeutic target in psychosis? Current challenges and future perspectives [J]. *Brain Behav Immun Health*, 2021, 17: 100–130.
- [20] 韩笑, 杨明, 崔承彬, 等. 高效液相色谱法定量测定巴戟天中菊淀粉型寡糖的含量[J]. 军事医学杂志(*Journal of Military Medicine Sciences*), 2011, 35(4): 296–298.
- [21] Anuszkiewicz M, Gwarris M, Konopaske P, *et al.* Butyric acid, a gut bacteria metabolite, lowers arterial blood pressure via colon-vague nerve signaling and GPR41/43 receptors [J]. *Pfluggers Arch*, 2019, 471(12): 1441–1453.
- [22] Lai WD, Tung TH, Teng CY, *et al.* Fish oil ameliorates neuropsychiatric behaviors and gut dysbiosis by elevating selected microbiota-derived metabolites and tissue tight junctions in rats under chronic sleep deprivation [J]. *Food Function*, 2022, 13(5): 2662–2680.
- [23] Mrozowski LA, Dixon WT, McBurney MI, *et al.* Short-chain fatty acids and total parenteral nutrition affect intestinal gene expression [J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2002, 26(3): 145–150.
- [24] Szałach LP, Lisowska KA, Cabbala WJ. The influence of antidepressants on the immune system [J].

- Arch Immunol Ther Exp (Warez), 2019, 67(3): 143-151.
- [25] Jeon YW, Han SI, Park EJ. The relation between immunologic variables and symptom factors in patients with major depressive disorder [J]. *Ann Gen Psychiatry*, 2018, 17: 25-32.
- [26] Sutçigil L, Oktenli C, Mossback U, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy [J]. *Clin Dev Immunol*, 2007, 27: 763-796.
- [27] Hong M, Zheng J, Ding ZY, et al. Imbalance between Th17 and Treg cells may play an important role in the development of chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2013, 20(1): 39-50.
- [28] Kappelmann N, Dantzer R, Kandace GM. Interleukin-6 as potential mediator of long-term neuropsychiatric symptoms of COVID-19 [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2021, 131: 105-125.
- [29] Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation [J]. *Nature*, 2013, 504 (7480): 451-455.
- [30] Xie R, Jiang P, Lin L, et al. Association of lymphoid tissue-resident commensal bacteria in mice with depressive-like behaviors induced by chronic social defeat stress [J]. *FASEB J*, 2020, 34(6): 8310-8325.
- [31] Westfall S, Caracci F, Zhao D, et al. Microbiota metabolites modulate the T helper 17 to regulatory T cell (Th17/Treg) imbalance promoting resilience to stress-induced anxiety- and depressive-like behaviors [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 91: 350-368.
- [32] Westfall S, Caracci F, Estill M, et al. Chronic stress-induced depression and anxiety priming modulated by gut-brain-axis immunity [J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 650670 (2021-06-24) [2022-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34248950/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.670500.
- [33] Ambrée O, Ruland C, Zangger P, et al. Social defeat modulates T helper cell percentages in stress susceptible and resilient mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (14): 682-697.
- [34] 蔡兵, 崔承彬, 陈玉华, 等. 巴戟天中菊淀粉型低聚糖类单体成分对小鼠的抗抑郁作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志(*Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*), 1996, 10(2): 109-112.
- [35] 张有志, 李云峰, 刘刚, 等. 巴戟天寡糖对大鼠获得性无助抑郁模型的影响[J]. 中国行为医学与脑科学杂志(*Chinese Journal of Behavioral Medicine and Brain Science*), 2005, 15(4): 309-311.
- [36] Purgato M, Gastaldon C. Drug dose as mediator of treatment effect in antidepressant drug trials: the case of fluoxetine[J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2015, 131(6): 408-416.

Inulin-type oligosaccharides of *Morinda officinalis* regulate number of regulatory T cells in chronic unpredictable stress model mice while improving their depression and anxiety-like behavior

WANG Yi¹, GUO Ting-ting², YIN Yong-yu¹, ZHANG Li-ming¹, ZHANG Ji-yan², LI Yun-feng^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Institute of Pharmacology and Toxicology, 2. Institute of Military Cognitive and Brain Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: OBJECTIVE To assess the effects of antidepressant inulin-type oligosaccharides of *Morinda officinalis* (IOMO) on depressive and anxiety-like behaviors in chronically stress model mice, investigate the effects of IOMO on regulatory T cells (Tr cells) in the intestinal epithelium and spleen of chronically-stressed model mice, and to offer new clues to the antidepressant mechanism of oligosaccharide components. **METHODS** A chronic unpredictable stress (CUS) depression model was established. The mice were divided into the normal control group, CUS model group, CUS+fluoxetine (FLX) group and CUS+IOMO group. IOMO 50 mg·kg⁻¹ or FLX 10 mg·kg⁻¹ was ig given to the mice from the first day of modeling for 28 consecutive days. The sucrose preference test (SPT) of mice was conducted to evaluate the sucrose preference of mice at the beginning and end of modeling. The opening filed

test (OFT) was used to investigate the anxiety-like behavior. The forced swimming test (FST) and novel inhibition feeding test (NSF) were used to study the depression-like behavior. Flow cytometry was used to observe the changes of Tr cells in intestinal epithelial lymphocytes and spleens of mice in each group. **RESULTS** After 28 days of CUS, the preference for sugar water in the CUS model group was significantly reduced in the SPT compared with the control group ($P<0.01$), so were the latency to enter the central area ($P<0.05$) and the total number of times of entry ($P<0.05$) in the OFT. Compared with the control group, the immobility time of mice was significantly prolonged ($P<0.05$) in the FST, so was the first feeding latency ($P<0.01$) in the NSF. Administration of IOMO or FLX could significantly reverse the above changes ($P<0.05$). The results of flow cytometry showed that the number of Tr cells in the intestinal epithelium and spleen of the CUS model group decreased significantly ($P<0.05$) compared with the control group. Compared with CUS model group, the number of Tr cells in the intestinal epithelium and spleen of mice in the CUS+IOMO group and CUS+FLX group was significantly increased ($P<0.05$). At the same time, correlation analysis showed that there was a significant correlation between the number of Tr cells in the intestinal epithelium and spleen and the changes in sucrose preference ($P<0.05$). **CONCLUSION** IOMO has significant anti-anxiety and anti-depression effects in CUS model mice, and can increase the number of Tr cells in the intestinal epithelium and spleen, which may be one of its important mechanisms.

Key words: depression; inulin-type oligosaccharides of *Morinda officinalis*; chronic unpredictable stress; regulatory T cells

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81773708); and National Natural Science Foundation of China (81173036)

Corresponding author: ZHANG Ji-yan, E-mail: jiyanzhang@hotmail.com; LI Yun-feng, E-mail: lyf619@aliyun.com

(收稿日期: 2022-01-10 接受日期: 2022-04-25)

(本文编辑: 赵楠)

欢迎订阅 2022 年《中国药理学与毒理学杂志》

《中国药理学与毒理学杂志》是由中国药理学会、中国毒理学会和军事医学研究院毒物药物研究所共同主办的高级学术性刊物, 1986 年创刊, 2016 年由双月刊改为月刊。被北大图书馆评为药学专业中文核心期刊(中文核心期刊要目总览), 同时还是中国科技核心期刊、中国核心学术期刊和中国生物医学核心期刊等。本刊被美国《生物学文摘(预评)》(BAP)和美国《化学文摘》(CA)等十余家数据库收录。

《中国药理学与毒理学杂志》设有前沿论坛、论著、实验方法和综述栏目。读者对象主要为从事药理学、毒理学、药学、医学和生物基础科学研究的工作者。本刊中英文稿件兼收, 更欢迎投英文稿件。

本刊全年 12 期, 每期定价 20.00 元。国内外公开发行, 国内邮发代号: 82-140, 国外邮发代号: BM-1051。本刊主要通过邮局订阅, 也可以联系编辑部商谈杂志订阅事宜。

地址: 北京市海淀区太平路 27 号六所《中国药理学与毒理学杂志》编辑部

邮编: 100850

电话: (010)66930636, (010)66931617

E-mail: cjpt518@163.com

网址: <http://cjpt.magtechjournal.com>