实验研究
Experiment

枸杞多糖通过调节肠道菌群改善孕鼠慢性应激导致的子代情绪变化

赵枫，关素珍，王凯，付有娟，刘红娅，陈小惠，戚发秋，刘志宏

宁夏医科大学公共卫生与管理学院，宁夏 银川 750004

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.20185

摘要：

[背景] 肠道菌群通过脑-肠轴系统影响大脑功能及机体应激反应。肠道菌群和大脑之间的关系对于子代的生长发育尤为重要。

[目的] 了解孕鼠慢性应激对子代肠道菌群的影响，初步探索枸杞多糖（LBP）对因孕期慢性应激而导致的子鼠情绪改变的改善作用及其可能机制。

[方法] 选择成年SD大鼠，雌鼠24只，分为对照组、模型组和模型+LBP组，雄鼠20只，分为对照交配组和模型交配组，采用慢性不可预知温和应激建立孕期慢性应激动物模型，并用LBP灌胃干预。子鼠分为对照子鼠组、模型子鼠组和模型+LBP子鼠组。子鼠出生后第20天，收集新鲜粪便，采用Illumina MiSeq测序技术，测定子鼠粪便中微生物16S rRNAV3-V4区序列，并对群落结构和多样性进行交互分析；在出生后第28天称量体重并内眦静脉采血，采用放射免疫法测定血浆皮质酮水平；在出生后42天利用旷场实验、蔗糖偏好实验以及悬尾实验进行情绪变化的测定。

[结果] 模型组和模型+LBP组雌鼠在应激第7、14天血浆皮质酮水平分别较对照组升高（$P<0.05$），提示雌鼠在孕期处于应激状态。LBP干预后，模型+LBP子鼠组体重［(91.92±11.19) g］高于模型子鼠组［(81.06±15.71) g］（$P<0.05$）；模型+LBP子鼠组水平运动［(77.47±10.67) 分］高于模型子鼠组［(67.32±11.39) 分］（$P<0.05$）；模型+LBP子鼠组1%蔗糖偏好百分比［(67.00±6.00) %］高于模型子鼠组［(59.00±8.00) %］（$P<0.05$）；模型+LBP子鼠组静止时间［(113.39±16.75) s］短于模型子鼠组［(152.13±33.26) s］（$P<0.05$）。α多样性分析显示，模型+LBP子鼠组Sobs指数（377.20±30.03）高于模型子鼠组（311.00±11.87）（$P<0.05$），模型+LBP子鼠组Ace指数（409.38±16.06）高于模型子鼠组（376.33±19.53）（$P<0.05$）；模型+LBP子鼠组厚壁菌门的相对丰度高于模型子鼠组，模型+LBP子鼠组毛螺菌科的相对丰度高于模型子鼠组。反应子鼠情绪的1%蔗糖偏好百分比与肠杆菌科丰度呈正相关（$r=0.59$），与拟杆菌科丰度呈正相关（$r=0.44$），与普雷沃氏菌科丰度呈负相关（$r=-0.47$）；静止时间与肽链球菌科丰度呈负相关（$r=-0.51$）；水平运动得分与双歧杆菌科丰度呈负相关（$r=-0.48$）（$P<0.05$）。

[结论] 孕期慢性应激不仅导致母体处于较高的应激水平，而且其子代的应激水平也较高。LBP可以缓解孕期慢性应激导致的母体高应激状态，可能对子代肠道菌群的定植和物种的组成及多样性产生积极影响，改善因孕期慢性应激所导致的子鼠情绪变化。

关键词：枸杞多糖；肠道菌群；孕期慢性应激；子代；情绪变化

Regulation of *Lycium barbarum* polysaccharide on gut microbiota and emotional change of offspring caused by chronic stress of pregnant rats

ZHAO Feng, GUAN Su-zhen, WANG Kai, FU You-juan, LIU Hong-ya, CHEN Xiao-hui, QI Fa-qiu, LIU Zhi-hong (School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract:

[Background] Gut microbiota may affect brain function and stress response through the modulation of gut-brain axis (GBA). The relationship between gut microbiota and brain is particularly important for the growth and development of offspring.

[Objective] This experiment investigates the effect of chronic stress of pregnant rats on the gut microbiota of progeny, and preliminarily explores the improving effect of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on the emotional change of offspring caused by chronic stress during pregnancy and its possible mechanism.

基金项目
国家自然科学基金地区基金（81960591）；宁夏自然科学基金（2018AAC02007）；宁夏回族自治区卫生计生委重点研究课题（2018-NW-006）；宁夏医科大学2018年校级科研基金项目（2018-1）；宁夏医科大学2020年自治区级大学生创新创业训练计划项目（S202010752007）

作者简介
赵枫（1994—），男，硕士生；
E-mail：zhaofeng0205@163.com

通信作者
刘志宏，E-mail：lzh_2580@sina.com

伦理审批 已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2020-04-24
录用日期 2020-10-08

文章编号 2095-9982(2020)11-1112-07
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
赵枫，关素珍，王凯，等.枸杞多糖通过调节肠道菌群改善孕鼠慢性应激导致的子代情绪变化[J].环境与职业医学，2020，37(11)：1112-1118.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20185

Funding
This study was funded.

Correspondence to
LIU Zhi-hong, E-mail: lzh_2580@sina.com

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2020-04-24
Accepted 2020-10-08

▸To cite
ZHAO Feng, GUAN Su-zhen, WANG Kai, et al. Regulation of *Lycium barbarum* polysaccharide on gut microbiota and emotional change of offspring caused by chronic stress of pregnant rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(11): 1112-1118.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20185

[Methods] Twenty-four adult female SD rats were divided into a control group, a model group, and a model + LBP group; twenty adult male SD rats were divided into a control group and a model group. Chronic unpredictable mild stress (CUMS) was used to establish a rat model of chronic stress during pregnancy, and intragastric intervention was performed with LBP. The offspring rats were divided into a control offspring group, a model offspring group, and a model + LBP offspring group. The offspring's fresh stool samples were collected on postnatal day 20, the sequence of 16S rRNAV3-V4 regions of microorganisms in the feces of offspring was determined by Illumina MiSeq technique, and the interaction between microbial community structure and diversity were analyzed; their plasma corticosterone levels were detected by radioimmunoassay on postnatal day 28; their emotional changes were measured by open field test, sucrose preference test, and tail suspension test on postnatal day 42.

[Results] The plasma corticosterone levels of the female rats in the model group and the model + LBP group on the 7th and 14th days of stress were higher than that of the control group ($P<0.05$), suggesting that the female rats were in stress during pregnancy. After the LBP intervention, the model + LBP offspring group showed higher body weight, horizontal movement score, and 1% sucrose preference percentage, and shorter resting time than the model group did [(91.92±11.19) g vs. (81.06±15.71) g; (77.47±10.67) vs. (67.32±11.39); (67.00±6.00)% vs. (59.00±8.00)%; (113.39±16.75) s vs. (152.13±33.26) s] ($P<0.05$). The results of α diversity analysis showed that the Sobs index of the model + LBP offspring group (377.20±30.03) was higher than that of the model offspring group (311.00±11.87) ($P<0.05$), and the Ace index of the model + LBP offspring group (409.38±16.06) was higher than the model offspring group (376.33±19.53) ($P<0.05$). The relative abundance of Firmicutes phylum in the model+LBP offspring group was higher than that in the model offspring group, so was Lachnospiraceae family. The offspring's 1% sucrose preference percentage was positively associated with Enterobacteriaceae abundance (r=0.59) and Bacteroidaceae abundance (r=0.44), and negatively associated with Prevotella Shan and Collins abundance (r=–0.47); resting time was negatively associated with Streptococcus abundance (r=–0.51); horizontal movement score was negatively associated with Bifidobacterium abundance (r=–0.48) ($P<0.05$).

[Conclusion] Chronic stress during pregnancy causes not only the mothers but also the offspring to be in a stress state. LBP can alleviate the maternal elevated stress level caused by chronic stress during pregnancy, positively affect the colonization of offspring's gut microbiota and the composition and diversity of microbial species, and improve the emotional changes of offspring caused by chronic stress during maternal pregnancy.

Keywords: *Lycium barbarum* polysaccharide; gut microbiota; chronic stress during pregnancy; offspring; emotional change

在妊娠期这一特殊时期，各种急、慢性应激不仅会对母体的健康产生影响，而且会对子代的生长发育产生深远影响[1]。妊娠期应激刺激时间过长，会导致子代注意力变弱，情绪和行为发生变化[2]。枸杞多糖（*Lycium barbarum* polysaccharide，LBP）是枸杞的主要活性成分，富含多种微量元素和氨基酸，具有抗应激、抗疲劳、增强免疫力等作用[3-4]。大鼠预防性摄入LBP可以提高突触后致密蛋白的表达水平，促进神经元信号传导，从而改善由皮质酮诱导的抑郁症相关症状[5]。肠道菌群通过脑-肠轴（gut-brain axis，GBA）系统影响大脑功能及机体应激反应，参与情绪、行为和认知功能的调节[6-7]。肠道菌群与大脑之间的关系对于子代的生长发育尤为重要，子代在出生时就接受了它的共生肠道菌群，菌群失调可能导致神经发育的改变[8]。因此，本研究基于GBA理论，建立孕期慢性应激动物模型，利用LBP进行干预，探讨LBP对因孕期慢性应激而导致的子鼠情绪改变的改善作用。

1 对象与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本研究选择成年健康SD大鼠，购自宁夏医科大学实验动物中心，合格证编号：SCXK（宁）2015-0001。其中24只雌鼠，体重（200±20）g，随机分为模型组、模型+LBP组以及对照组，每组8只，称重并编号，模型组和模型+LBP组雌鼠均为单笼饲养（有助于模型的建立）[9]，对照组雌鼠每笼2只。20只雄鼠，体重（200±20）g，抽签决定分为对照交配组4只和模型交配组16只，每笼雄鼠2只，适应性饲养1周。实验程序经宁夏医科大学实验动物中心实验动物福利委员会审核，编号：IACUC-NYLAC-2019-089。

1.1.2 主要仪器和试剂 ^{131}I皮质醇放射免疫试剂盒（北京北方生物技术研究所，中国），LBP（北京索莱宝科技有限公司，中国），ELISA试剂盒（上海江莱生物科技有限公司，中国），电子秤（DS-88型，武汉自动化仪表厂，中国）。

1.2 动物分组与造模

1.2.1 模型选择 建立慢性不可预知温和应激（chronic unpredictable mild stress，CUMS）动物模型[9]。模型周期为21 d，具体应激方式包括：①24 h食物剥夺；②24 h拥挤环境（8只合笼，笼具倾斜30°）；③24 h水剥夺；④24 h潮湿环境（湿度60%~70%）；⑤1 h温水游泳（31 ℃）；⑥30 min摇晃（1次·s^{-1}）；⑦30 min行为束缚；⑧5 min热应激（42 ℃）；⑨1 min夹尾（距尾尖1 cm处）。每天随机安排1种应激方式，应激完成后放回原饲养间。应激方式①②③④在安排当天开始，进行24 h，余应激方式均在当天早上10:00—12:00

进行。

1.2.2 孕期应激 在应激周期第3天，模型组和模型+LBP组雌鼠与模型交配组雄鼠1∶1进行合笼交配，次日早晨检查雌鼠阴栓（或阴道涂片），明确妊娠后，将雌雄鼠分离，孕鼠继续单笼饲养。在合笼过程中，应激照常进行。对照组雌鼠与对照交配组雄鼠同时期2:1进行合笼交配，确定妊娠后，雌雄分离，对照组孕鼠每笼2只，从孕第18天开始单笼饲养。

1.2.3 LBP干预 在应激周期第8天，模型+LBP组雌鼠于每日14:00根据母鼠体重灌服相应剂量的LBP溶液（溶于生理盐水），染毒剂量为40 mg·kg^{-1}（以体重计）[10]，其余两组灌服相应剂量的生理盐水，连续灌胃14 d，直至应激结束。

1.2.4 子鼠分组及饲养环境 分娩后，给各组孕鼠提供充足的水和食物。子鼠于出生后第21天（PND21）断乳，雌雄分笼饲养。随机选取各组不同窝别的子鼠16只，雌雄各半，编号进入对照子鼠组、模型子鼠组、模型+LBP子鼠组。均饲养于正常环境，每笼4只。见图1。

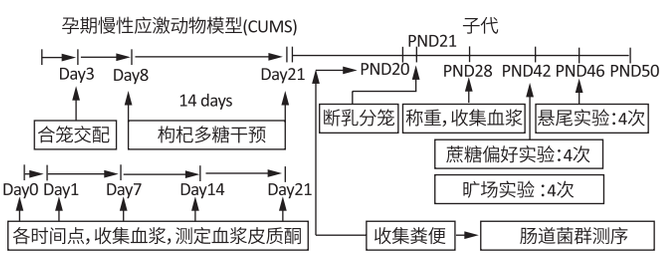


图1 动物模型制备、干预和指标测定的时间轴

Figure 1 Timeline of animal model preparation, intervention, and index determination

1.3 指标测定方法

1.3.1 血浆皮质酮水平测定及体重称量 所有雌鼠在应激前1天以及应激第1、7、14、21天进行内眦静脉采血，子鼠在PND28进行内眦静脉采血，收集血浆，-80℃冰箱冷冻待测。利用^{131}I皮质醇放射免疫试剂盒测定血浆皮质醇浓度，根据公式$C_{皮质酮}=50\times C_{皮质醇}$[11]得到血浆皮质酮质量浓度。子鼠在PND28进行体重称量。

1.3.2 子鼠情绪变化测定 子鼠在PND42进行蔗糖偏好实验[12]。首先训练子鼠适应含蔗糖饮水，每笼放置2个装有1%蔗糖水的水瓶，自由饮水24 h后，禁食禁水24 h，次日早晨10:00同时给予每只子鼠2瓶称量好的水（1瓶1%蔗糖水，1瓶纯水），自由饮水1 h后，取走并测量，其余时间给予充足的食物及自由饮水（纯水）。测量指标包括：①蔗糖水消耗量，②纯水消耗量，③总液体消耗量，④1%蔗糖偏好百分比=（蔗糖水消耗量/总液体消耗量）×100%。连续测量4 d，取平均值。

旷场实验[12]与蔗糖偏好实验同时期进行。自制的敞箱呈立方体（80 cm×80 cm×40 cm），四周壁涂为黑色，底面由25块面积相等的方格子组成。将子鼠放入敞箱中央位置，开始计时3 min，以动物经过的底面方格块数（3爪及以上跨入方格内）为水平运动得分，1块记为1分；以动物直立次数（攀附墙壁或两前爪腾空）为垂直运动得分，1次记为1分。实验连续4 d，取平均值。定期清洁敞箱，保证测定效果。

在PND46进行悬尾实验[12]。将子鼠倒悬固定在悬尾实验箱上（距子鼠尾尖约5 cm），保证子鼠头部距离实验台面约20 cm。主要指标为6 min内的静止时间，表现出失望状态，并记录子鼠的挣扎次数。整个过程中两侧用黑色纸板隔开动物的视线。连续测定4 d，取平均值。PND50处死子鼠。

1.3.3 肠道菌群测序及分析 收集PND20子鼠的新鲜粪便（n=6）于无菌冻存管-80℃冰箱保存待测。所有样品用干冰保存送至上海美吉生物医药科技有限公司进行16S rRNA的测序。引物名称338F_806R；F端序列：5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′；R端序列：5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′；扩增长度为468 dp。扩增程序：95℃预变性3 min，95℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸30 s，以上27个循环；然后72℃稳定延伸10 min；最后4℃保存。利用Illumina公司的MiSeq PE300平台测定大鼠粪便中微生物16S rRNA V3-V4区序列，并对群落结构和多样性进行比较分析。α多样性分析反映样品的物种丰度及多样性，常用Ace指数用来衡量物种丰富度，用Simpson指数衡量物种多样性[13]。

1.4 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，雌鼠血浆皮质酮采用重复测量的方差分析，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较用LSD-t法；子鼠情绪与肠道菌群相关性采用Pearson积差相关分析。检验水准α=0.05，双侧检验。

2 结果

2.1 孕期慢性应激对雌鼠血浆皮质酮的影响

经重复测量资料方差分析发现：各组雌鼠血浆皮质酮的质量浓度存在差异（F=5.76，P<0.05）。进一步LSD-t比较发现：模型组和模型+LBP组雌鼠血浆皮

质酮的质量浓度在应激后第7天、第14天均高于对照组（P<0.05）。见表1。

表1 孕期慢性应激对雌鼠血浆皮质酮的影响（n=8，$\bar{x}\pm s$）

Table 1 The effect of chronic stress during pregnancy on maternal plasma corticosterone (n=8, $\bar{x}\pm s$)

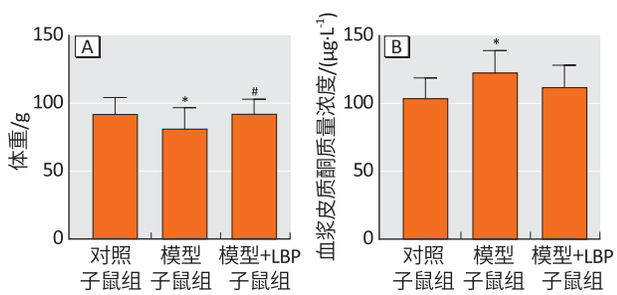
单位（Unit）：μg·L^{-1}

组别	应激前1天	应激后			
		第1天	第7天	第14天	第21天
对照组	80.44±22.59	95.91±42.74	95.04±14.58	105.48±14.10	96.12±16.92
模型组	81.14±27.78	92.41±16.47	132.26±32.42*	161.46±18.32*	128.53±42.86
模型+LBP组	88.25±13.10	88.77±15.82	129.81±17.04*	149.07±17.41*	101.88±22.39

［注］*：与同一时间点对照组比较，P<0.05。

2.2 LBP对孕期慢性应激子鼠体重和血浆皮质酮的影响

各组子鼠在PND28的体重和血浆皮质酮质量浓度均存在差异（F_1=3.381，F_2=3.427；P<0.05）。对照子鼠组体重［(91.75±12.57) g］高于模型子鼠组［(81.06±15.71) g］（P<0.05），且模型+LBP子鼠组体重［(91.92±11.19) g］也高于模型子鼠组（P<0.05）。对照子鼠组血浆皮质酮质量浓度［(103.58±15.28) μg·L^{-1}］低于模型子鼠组［(122.40±16.59) μg·L^{-1}］（P<0.05）。见图2。



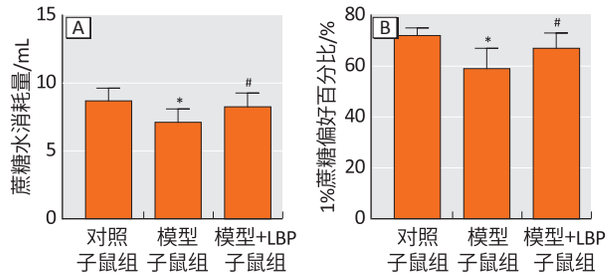
［注］*：与对照子鼠组相比，P<0.05；#：与模型子鼠组相比，P<0.05。

图2 各子鼠组PND28时体重（A）和血浆皮质酮质量浓度（B）（n=16）

Figure 2 Body weight (A) and plasma corticosterone (B) in each offspring group on PND28 (n=16)

2.3 LBP对孕期慢性应激致子鼠情绪变化的影响

2.3.1 蔗糖偏好实验结果的比较 各组子鼠蔗糖水消耗和1%蔗糖偏爱百分比之间均存在差异（F_1=4.701，F_2=7.162；P<0.05）。对照子鼠组蔗糖水消耗量［(8.69±0.94) mL］高于模型子鼠组［(7.12±0.99) mL］（P<0.05），对照子鼠组1%蔗糖偏好百分比［(72.00±3.00) %］高于模型子鼠组［(59.00±8.00) %］（P<0.05）；模型+LBP子鼠组蔗糖水消耗量［(8.25±1.03) mL］高于模型子鼠组（P<0.05），模型+LBP子鼠组1%蔗糖偏好［(67.00±6.00) %］高于模型子鼠组（P<0.05）。见图3。

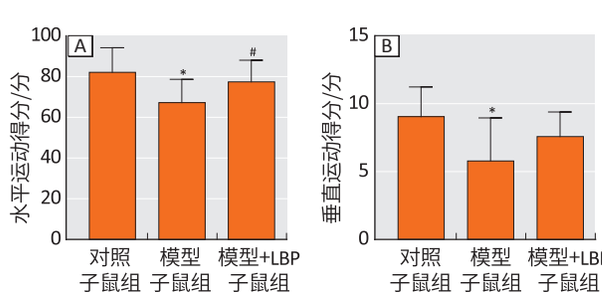


［注］*：与对照子鼠组相比，P<0.05；#：与模型子鼠组相比，P<0.05。

图3 各子鼠组PND42时蔗糖水消耗量（A）和1%蔗糖偏好百分比（B）的比较（n=16）

Figure 3 Comparison of sucrose water consumption (A) and 1% sucrose preference percentage (B) in each offspring group on PND42 (n=16)

2.3.2 旷场实验结果的比较 各组子鼠水平运动和垂直运动得分之间均存在差异（F_1=3.581，F_2=3.521；P<0.05）。模型子鼠组水平运动得分［(67.32±11.39) 分］低于对照子鼠组［(82.23±12.00) 分］（P<0.05），模型子鼠组垂直运动得分［(5.79± 3.17) 分］也低于对照子鼠组［(9.05±2.19) 分］（P<0.05）；模型+LBP子鼠组水平运动得分［(77.47± 10.67) 分］高于模型子鼠组（P<0.05）。见图4。

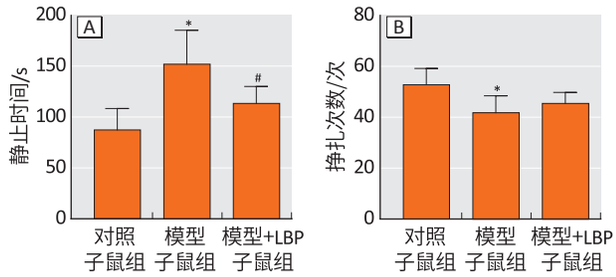


［注］*：与对照子鼠组相比，P<0.05；#：与模型子鼠组相比，P<0.05。

图4 各子鼠组PND42时水平运动得分（A）和垂直运动得分（B）的比较（n=16）

Figure 4 Comparison of horizontal movement score (A) and vertical movement score (B) in each offspring group on PND42 (n=16)

2.3.3 悬尾实验结果的比较 各组子鼠在静止时间和挣扎次数之间均存在差异（F_1=9.462，F_2=4.932；P<0.05）。模型子鼠组静止时间［(152.13±33.26) s］长于对照子鼠组［(87.37±21.10) s］（P<0.05），且模型子鼠组挣扎次数［(41.83± 6.66) 次］少于对照子鼠组［(52.80±6.46) 次］（P<0.05）；模型+LBP子鼠组静止时间［(113.39±16.75) s］短于模型子鼠组（P<0.05）。见图5。



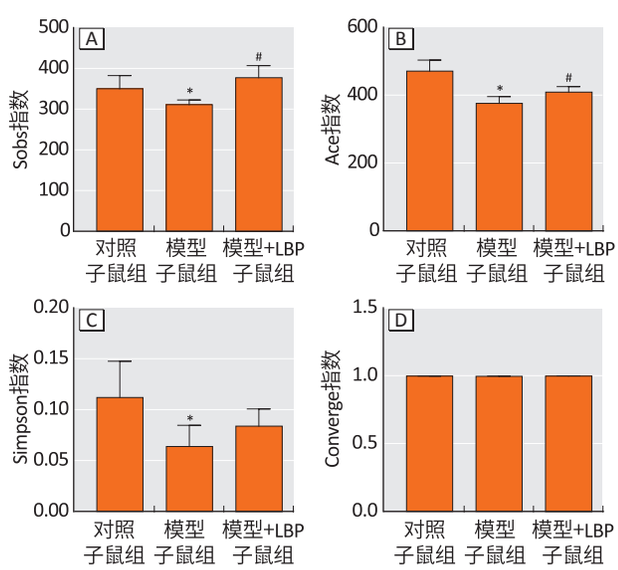
[注] *：与对照子鼠组相比，$P<0.05$；#：与模型子鼠组相比，$P<0.05$。

图5 各子鼠组PND46时静止时间（A）和挣扎次数（B）的比较（n=16）

Figure 5 Comparison of resting time (A) and number of struggles (B) in each offspring group on PND46 (n=16)

2.4 LBP对孕期慢性应激致子鼠肠道菌群组成及多样性改变的影响

2.4.1 α多样性分析 各组子鼠Sobs、Simpson、Ace指数均存在差异（F_1=7.857，F_2=4.525，F_3=21.009；$P<0.05$）。模型子鼠组Sobs指数（311.00± 11.87）低于对照子鼠组（350.00±32.72）（$P<0.05$），Ace指数（376.33±19.53）低于对照子鼠组（471.48±32.04）（$P<0.05$），Simpson指数（0.07±0.02）低于对照子鼠组（0.11±0.03）（$P<0.05$）。模型+LBP子鼠组Sobs指数（377.20±30.03）高于模型子鼠组（$P<0.05$），Ace指数（409.38±16.06）高于模型子鼠组（$P<0.05$）。各子鼠组Converge指数差异没有统计学意义。见图6。



[注] A：Sobs指数；B：Ace指数；C：Simpson指数；D：Converge指数。*：与对照子鼠组相比，$P<0.05$；#：与模型子鼠组相比，$P<0.05$。

图6 各子鼠组PND20时粪便样品肠道菌群α多样性分析（n=6）

Figure 6 Analysis of α diversity of gut microbiota in stool samples of each offspring group on PND20 (n=6)

2.4.2 子鼠肠道菌群门水平的物种组成 各组子鼠门水平物种以厚壁菌门、拟杆菌门为主。模型子鼠组厚壁菌门的相对丰度（52.95%）低于对照子鼠组（60.24%），模型+LBP子鼠组厚壁菌门的相对丰度（58.51%）高于模型子鼠组；模型子鼠组拟杆菌门相对丰度（39.31%）高于对照子鼠组（35.99%），模型+LBP子鼠组（36.03%）较模型子鼠组降低。见图7。

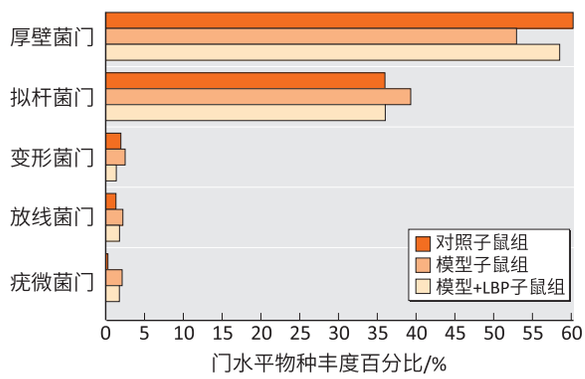


图7 各子鼠组肠道菌群门水平的物种组成（n=6）

Figure 7 Species composition at the phylum level of gut microbiota in each offspring group (n=6)

2.4.3 子鼠肠道菌群科水平的物种组成 各组子鼠在科水平相对丰度较高的物种为乳杆菌科、穆氏杆菌科。其中模型子鼠组乳杆菌科的相对丰度（30.90%）低于对照子鼠组（35.48%）；对照子鼠组穆氏杆菌科的相对丰度（19.64%）低于模型子鼠组（21.47%），模型+LBP子鼠组相对丰度（19.04%）低于模型子鼠组。见图8。

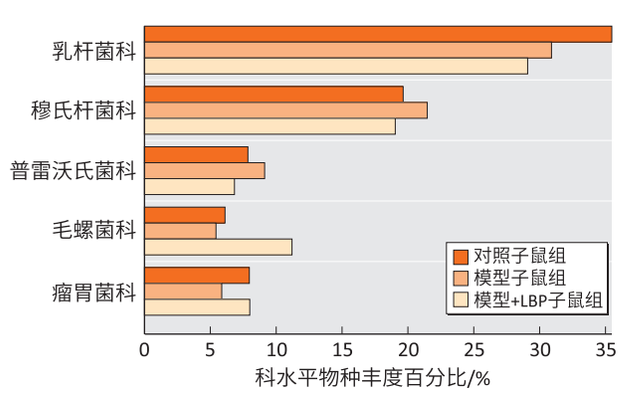


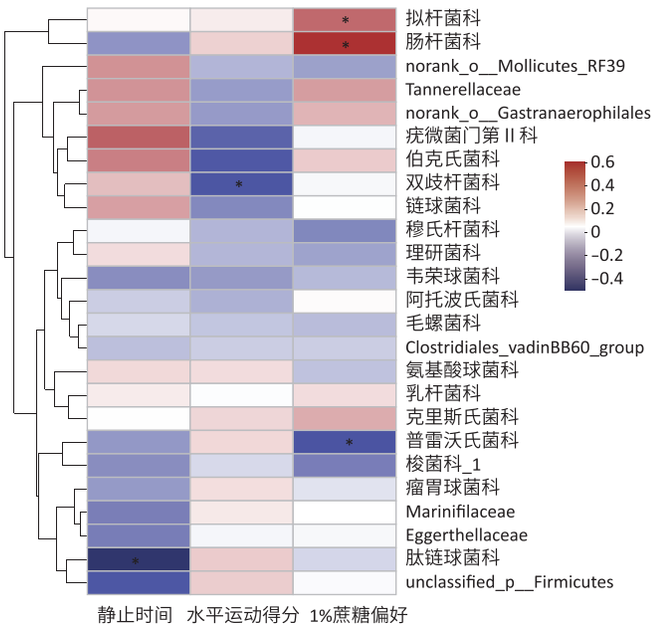
图8 各子鼠组肠道菌群科水平的物种组成（n=6）

Figure 8 Species composition at the family level of gut microbiota in each offspring group (n=6)

2.5 子鼠情绪与肠道菌群之间的相关性分析

反映子鼠情绪的1%蔗糖偏好百分比与肠杆菌科丰度呈正相关（r=0.59，$P<0.05$），与拟杆菌科丰度呈正相关（r=0.44，$P<0.05$），与普雷沃氏菌科丰度呈负相关（r=-0.47，$P<0.05$）；静止时间与肽链球菌科丰度呈负相关（r=-0.51，$P<0.05$）；水平运动得分与双

歧杆菌科丰度呈负相关（r=-0.48，P<0.05）。见图9。



［注］*：P<0.05。

图9 子鼠情绪相关指标与肠道菌群物种之间的相关性

Figure 9 Correlation between emotion-related indicators of offspring and gut microbiota species

3 讨论

本研究中，模型组和模型+LBP组雌鼠在应激第7、14天血浆皮质酮表达水平均高于同时期的对照组，提示雌鼠在孕期处于应激状态。有研究报道，孕期受到压力事件刺激，会导致低体重儿明显增多[14]。本研究结果显示，模型子鼠组体重低于其他组，且孕期慢性应激导致子鼠血浆皮质酮水平较高。饮食和摄水剥夺作为应激方式，在一定程度会影响子鼠的营养状况，其安排的应激时间点在应激第1、7、14天，在这些时间点对照组同样禁食禁水（实施蔗糖偏好实验），子鼠体重明显降低是整个应激刺激的结果。下丘脑-垂体-肾上腺（hypothalamic-pituitary-adrenal，HPA）轴作为机体应激反应的重要神经内分泌轴，在机体受到应激时易受到损伤[15]，孕期应激不仅导致母体HPA轴发生改变，而且对子代出生后早期HPA轴产生影响[16]。

悬尾实验是一种反映失望情绪的经典方法。结果显示，孕期应激会导致子代出现间断性不动的时间延长，显示出失望状态，与以前的研究[17]结果类似，LBP干预组子代的静止时间减少且挣扎次数增多。目前多采用蔗糖偏好实验来进行“快感缺失”相关指标的测定，本研究结果显示，孕期应激会导致子代对幸福事件的反应能力下降，与关素珍等[18]的研究结果相似，LBP干预则导致子代对幸福事件的反应能力提高。旷场实验的结果显示，孕期慢性应激会导致子代社交和运动能力下降，与Badache等[19]结果类似，LBP干预后其子代的运动能力明显增强。以上结果表明LBP对孕期慢性应激导致的子鼠情绪变化有改善作用。

研究表明，应激可以改变机体的肠道菌群[20]，并对子代肠道菌群的后期演变具有直接影响[21]。α多样性分析显示，孕期慢性应激会导致子代肠道菌群的物种丰度与多样性降低；门水平物种组成分析显示，孕期慢性应激导致子代厚壁菌门丰度降低，拟杆菌门丰度增加；科水平物种组成分析显示，孕期慢性应激导致子鼠乳杆菌科和毛螺菌科等优势菌群的丰度降低，与相关的研究[22]报道类似。这些改变提示，孕期慢性应激引起了子代肠道菌群紊乱。此外，孕期母鼠接受LBP干预后，其子代肠道菌群物种丰度及多样性均升高，相关优势菌科的物种丰度增加，有研究报道，LBP可促进短链脂肪酸的产生并调节肠道菌群的组成[23]。越来越多的证据表明，肠道菌群通过GBA参与情绪、行为和更高认知功能的调节，肠道菌群对宿主神经系统的发育有重要影响[24]，内脏高敏感、焦虑、精神分裂症和自闭症样行为等多种认知表现与肠道菌群组成的改变有关联[25]。相关性分析显示，反映子代情绪的相关指标与子代肠道菌群的部分物种存在一定的相关关系，表明子鼠的情绪损伤可以通过肠道菌群的物种组成而得到改善。

综上所述，孕期慢性应激不仅导致母体应激水平升高，而且导致其子代的应激水平升高；LBP可以缓解孕期慢性应激导致的母体高应激状态，可能对子代肠道菌群的定植和物种的组成及多样性产生积极影响，起到改善子代情绪变化的作用。

参考文献

［1］SAKHARKAR A J，VETRENO R P，ZHANG H，et al. A role for histone acetylation Mechanisms in adolescent alcohol exposure-induced deficits in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis markers in adulthood［J］. Brain Struct Funct，2016，221（9）：4691-4703.

［2］PLANT D T，PAWLBY S，SHARP D，et al. Prenatal maternal depression is associated with offspring inflammation at 25 years：a prospective longitudinal cohort study［J］. Transl Psychiatry，2016，6（11）：e936.

[3] MASCI A，CARRADORI S，CASADEI M A，et al. *Lycium barbarum* polysaccharides：extraction，purification，structural characterisation and evidence about hypoglycaemic and hypolipidaemic effects. A review [J]. Food Chem，2018，254：377-389.

[4] VARONI M V，PASCIU V，GADAU S D，et al. Possible antioxidant effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on hepatic cadmium-induced oxidative stress in rats [J]. Environ Sci Pollut Res，2016，24 (3)：2946-2955.

[5] 林幼红，刘晋锋，苏国辉，等. 枸杞多糖的神经保护作用——"以眼为鉴"[J]. 中国中医眼科杂志，2019，29 (5)：403-406.

[6] LIU X，CAO S，ZHANG X. Modulation of gut microbiota-brain axis by probiotics，prebiotics，and diet [J]. J Agric Food Chem，2015，63 (36)：7885-7895.

[7] CLARKE G，STILLING R M，KENNEDY P J，et al. Minireview：gut microbiota：the neglected endocrine organ [J]. Mol Endocrinol，2014，28 (8)：1221-1238.

[8] FRANKIENSZTAJN L M，ELLIOTT E，KOREN O. The microbiota and the hypothalamus-pituitary-adrenocortical (HPA) axis，implications for anxiety and stress disorders [J]. Curr Opin Neurobiol，2020，62：76-82.

[9] GUAN S Z，NING L，TAO N，et al. Effects of maternal stress during pregnancy on learning and memory via hippocampal BDNF，Arc (Arg3.1) expression in offspring [J]. Environ Toxicol Pharmacol，2016，46：158-167.

[10] 张琛，杨亚，加杨娥，等. 枸杞多糖对中波紫外线辐射后角质形成细胞炎症因子表达的影响 [J]. 中国医药导报，2017，14 (19)：20-23.

[11] LIU X H，QIAN L J，GONG J B，et al. Proteomic analysis of mitochondrial proteins in cardiomyocytes from Chronic stressed rat [J]. Proteomics，2004，4 (10)：3167-3176.

[12] 程梦静. NLRP3 KO小鼠肠道菌群对抑郁样行为的影响及其机制研究 [D]. 南京：东南大学，2019.

[13] YUAN Z，ZHANG C，PENG X，et al. Intestinal microbiota characteristics of mice treated with Folium senna decoction gavage combined with restraint and tail pinch stress [J]. 3 Biotech，2020，10 (4)：180.

[14] AE-NGIBISE K A，WYLIE B J，BOAMAH-KAALI E，et al. Prenatal maternal stress and birth outcomes in rural Ghana：sex-specific associations [J]. BMC Pregnancy Childbirth，2019，19 (1)：391.

[15] PALMER-BACON J，WILLIS-ESQUEDA C，SPAULDING W D. Stress，trauma，racial/ethnic group membership，and HPA function：Utility of hair cortisol [J]. Am J Orthopsychiatry，2020，90 (2)：193-200.

[16] KAPLAN L A，EVANS L，MONK C. Effects of mothers' prenatal psychiatric status and postnatal caregiving on infant biobehavioral regulation：can prenatal programming be modified? [J]. Early Hum Dev，2008，84 (4)：249-256.

[17] BUTKEVICH I，MIKHAILENKO V，VERSHININA E，et al. Maternal buspirone protects against the adverse effects of in utero stress on emotional and pain-related behaviors in offspring [J]. Physiol Behav，2011，102 (2)：137-142.

[18] 关素珍，宁丽，徐仙，等. 孕期慢性应激对子鼠情绪及海马组织中单胺类神经递质的影响 [J]. 环境与职业医学，2016，33 (9)：849-853.

[19] BADACHE S，BOUSLAMA S，BRAHMIA O，et al. Prenatal noise and restraint stress interact to alter exploratory behavior and balance in juvenile rats，and mixed stress reverses these effects [J]. Stress，2017，20 (3)：320-328.

[20] BASSETT S A，YOUNG W，FRASER K，et al. Metabolome and microbiome profiling of a stress-sensitive rat model of gut-brain axis dysfunction [J]. Sci Rep，2019，9 (1)：14026.

[21] SCOLA G，DUONG A. Prenatal maternal immune activation and brain development with relevance to psychiatric disorders [J]. Neuroscience，2017，346：403-408.

[22] ZIJLMANS M A，KORPELA K，RIKSEN-WALRAVEN J M，et al. Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota [J]. Psychoneuroendocrinology，2015，53：233-245.

[23] DING Y，YAN Y，CHEN D，et al. Modulating effects of polysaccharides from the fruits of *Lycium barbarum* on the immune response and gut microbiota in cyclophosphamide-treated mice [J]. Food Funct，2019，10 (6)：3671-3683.

[24] ERNY D，HRABĚ D E ANGELIS A L，JAITIN D，et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS [J]. Nat Neurosci，2015，18 (7)：965-977.

[25] MU C，YANG Y，ZHU W. Gut microbiota：the brain peacekeeper [J]. Front Microbiol，2016，7：345.

（英文编辑：汪源；责任编辑：汪源）