

脆弱拟杆菌 BF839 可改善 Fmr1 KO 小鼠在不同环境下的焦虑和多动行为

曾婷¹ 林楚慧¹ 邓宇虹¹ 林健泓² 肖枫² 尚鹤睿² 陈盛强²

¹广州医科大学附属第二医院临床营养科, 广州 510260; ²广州医科大学卫生管理学院应用心理系, 广州 511436

通信作者: 陈盛强, Email: chenshengq66@163.com

【摘要】 目的 观察脆弱拟杆菌 BF839 能否改善脆性 X 智力低下基因 1 (Fmr1) 敲除 (Fmr1 KO) 小鼠的焦虑和多动症状。**方法** 将 30 只 FVB 系 Fmr1 KO 小鼠 (3 周龄) 按随机数字表法分为 Fmr1 KO 组 ($n=15$) 和 Fmr1 KO+BF839 组 ($n=15$)。Fmr1 KO 组小鼠每天自由饮用高压灭菌自来水, Fmr1 KO+BF839 组小鼠每天自由饮用 BF839 菌液 (10 ml/d), 另有 11 只野生型 (WT) 小鼠作为对照组 (WT 组), 每天自由饮用高压灭菌自来水。干预 4 周后, 采用旷场实验观察小鼠行动的总路程, 以及在中央和周围的停留时间; 采用高架十字迷宫实验观察各组小鼠进入开放臂和封闭臂的时间和次数, 观察小鼠在不同环境下的焦虑和多动行为。**结果** 在旷场实验中, Fmr1 KO+BF839 组小鼠的总路程低于 Fmr1 KO 组小鼠, 但两组均高于 WT 组小鼠 [(8 613.57±1 379.13) cm 比 (9 852.19±1 994.97) cm 比 (4 335.07±1 332.97) cm, 均 $P<0.05$]。Fmr1 KO+BF839 组小鼠的中央停留时间高于 Fmr1 KO 组小鼠和 WT 组小鼠 [30.60 (22.20, 38.50) s 比 12.60 (5.60, 27.10) s, 7.40 (5.40, 14.20) s, 均 $P<0.05$]。而 Fmr1 KO 组小鼠的中央停留时间与 WT 组差异无统计学意义 ($P=0.396$)。Fmr1 KO+BF839 组小鼠的周边停留时间低于 Fmr1 KO 组小鼠 [269.20 (261.30, 277.60) s 比 292.01 (285.60, 293.40) s, $P<0.05$]。而两组小鼠的周边停留时间均与 WT 组 [279.50 (263.40, 288.90) s] 差异无统计学意义 (均 $P>0.05$)。在高架十字迷宫实验中, Fmr1 KO+BF839 组小鼠的开放臂次数比例低于 Fmr1 KO 组小鼠 [31.03 (26.47, 40.00) % 比 48.08 (42.86, 55.26) %, $P=0.002$]。而与 WT 组小鼠开放臂次数比例 [22.00 (18.00, 40.00) %] 差异无统计学意义 ($P=1.000$)。但 Fmr1 KO 组小鼠开放臂次数比例却高于 WT 组 ($P=0.001$)。Fmr1 KO+BF839 组小鼠的开放臂的时间比例低于 Fmr1 KO 组小鼠 [24.24 (12.16, 38.82) % 比 48.62 (34.85, 70.77) %, $P=0.020$]。与 WT 组 [11.00 (3.00, 34.00) %] 差异无统计学意义 ($P=0.953$)。而 Fmr1 KO 组小鼠的开放臂的时间比例高于 WT 组小鼠 ($P=0.001$)。Fmr1 KO+BF839 组小鼠的进入臂总次数与 Fmr1 KO 组小鼠差异无统计学意义 ($P=0.921$)。但两组均高于 WT 组小鼠 [41.00 (30.00, 58.00) 次, 40.00 (34.00, 48.00) 次比 24.00 (20.00, 28.00) 次, 均 $P<0.05$]。**结论** 对 Fmr1 KO 组小鼠早期使用 BF839 干预, 能恢复小鼠在安全环境下的焦虑行为, 以及压力下的正常焦虑反应 (抗焦虑样行为), 对安全环境下的多动行为也有轻度改善作用, 提示 BF839 有潜力治疗脆性 X 综合征。

【关键词】 脆弱拟杆菌 839; 脆性 X 综合征; 孤独症谱系障碍; 焦虑

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2022A1510101414); 广州市重点领域研发计划脑科学与类脑研究项目 (202206060004); 广州市卫生健康科技项目一般引导项目 (20201A011081)

DOI: 10.3760/ema.j.cn115668-20230313-00047

Bacteroides fragilis BF839 can improve anxiety and hyperactivity of fragile X-mental retardation gene 1 knockout mice under different environments

Zeng Ting¹, Lin Chuhui¹, Deng Yuhong¹, Lin Jianhong², Xiao Feng², Shang herui², Chen Shengqiang²

¹Department of Clinical Nutrition, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China; ²Department of Applied Psychology, Medical Administration College, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China

Corresponding author: Chen Shengqiang, Email: chenshengq66@163.com

[Abstract] Objective To investigate whether bacteroides fragilis BF839 can improve anxiety and hyperactivity symptoms of fragile X-mental retardation gene 1 (Fmr1) knockout (KO) mice. **Methods** Thirty FVB strain Fmr1 KO mice (3 weeks old) were divided into Fmr1 KO group ($n=15$) and Fmr1 KO+BF839 group ($n=15$). the Fmr1 KO group mice freely drank autoclaved tap water everyday; the Fmr1 KO+BF839 group mice were given free drinking BF839 bacterial liquid (10 ml/d) everyday; and another 11 wild type mice served as control (WT group) were given free drinking autoclaved tap water every day. After 4 weeks of intervention, the open field test was used to observe the total distance of the mice, and the residence time in the center and around the center; the elevated plus maze test was used to observe the time and times of entering the open arm and the closed arm of the mice in each group. To observe the anxiety and hyperactivity behavior of mice in different environments. **Results** In the open field experiment, the total distance of Fmr1 KO+BF839 group mice was lower than that of Fmr1 KO group mice, but both groups were higher than WT group mice [(8 613.57±1 379.13) cm vs (9 852.19±1 994.97) vs (4 335.07±1 332.97) cm, all $P<0.05$]. The central residence time of the Fmr1 KO+BF839 group mice was higher than that of the Fmr1 KO group mice and the WT group mice [30.60 (22.20, 38.50) s vs 12.60 (5.60, 27.10) s, 7.40 (5.40, 14.20) s, all $P<0.05$], while the central residence time of the Fmr1 KO group mice was not significantly different from the WT group mice ($P=0.396$). The peripheral residence time of the Fmr1 KO+BF839 group mice was lower than that of the Fmr1 KO group mice [269.20 (261.30, 277.60) s vs 292.01 (285.60, 293.40) s, $P<0.05$]. However, there was no statistically significant difference in peripheral residence time between the two groups of mice and the WT group mice [279.50 (263.40, 288.90) s] (both $P>0.05$). In the elevated plus maze test, the percent of open-arm entries in Fmr1 KO+BF839 group mice was lower than that in the Fmr1 KO group mice [31.03 (26.47, 40.00)% vs 48.08 (42.86, 55.26)%, $P=0.002$], while there was no statistically significant difference in percent of open-arm entries between the Fmr1 KO group mice and the WT group mice [22.00 (18.00, 40.00)%] ($P=1.000$), the percent of open-arm entries Fmr1 KO group mice was higher than that in the WT group mice ($P=0.001$). the percent of open-arm time in the Fmr1 KO+BF839 group mice was lower than that in the Fmr1 KO group mice [24.24 (12.16, 38.82)% vs 48.62 (34.85, 70.77)%, $P=0.020$], and there was no statistically significant difference ($P=0.953$) compared to the WT group mice [11.00 (3.00, 34.00)%], while the percent of open-arm time in the Fmr1 KO group mice was higher than that in the WT group mice ($P=0.001$). There was no statistically significant difference in the total arm entries between the Fmr1 KO+BF839 group mice and the Fmr1 KO group mice ($P=0.921$), but both groups were higher than the WT group mice [41.00 (30.00, 58.00) entries, 40.00 (34.00, 48.00) entries vs 24.00 (20.00, 28.00) entries, both $P<0.05$]. **Conclusions** Early intervention with BF839 in Fmr1 KO mice restores anxiety like behavior in a safe environment; Also restoring its normal anxiety response under stress (anxiolytic like behavior) also had a mild ameliorating effect on hyperactivity behavior in a safe environment, suggesting that BF839 has potential for treating fragile X syndrome.

[Key words] Bacteroides fragilis 839; Fragile X syndrome; Autism; Anxiety

Fund program: Natural Science Foundation of Guangdong (2022A1510101414); Guangzhou Key Field Research and Development Plan Brain Science and Brain Like Research Project (202206060004); General Guidance Project of Guangzhou Health Science and Technology Project (20201A011081)

DOI:10.3760/ema.j.cn115668-20230313-00047

脆性X综合征(FXS)是临床常见的神经发育障碍性疾病,可导致中重度智力低下或孤独症样行为,是由于X染色体上Fmr1基因的突变、重复表达引起其编码产物FMRP(一种核糖体相关的mRNA结合蛋白)缺乏致病^[1-5]。FXS常见的精神特征是焦虑、易激惹、情感障碍和躁狂症、注意缺陷与多动障

碍、重复和固执行为等,目前以抗精神病药对症治疗为主,但效果不佳且不良反应大,急需探索更有效的治疗途径^[6-7]。近年来,越来越多的证据表明,肠道菌群和神经系统异常相互联系,共同参与发病过程,肠道菌群紊乱会影响神经系统的发育和基因表达^[8-10]。Fmr1基因敲除(Fmr1 KO)小鼠是通过诱

导小鼠 *Fmr1* 基因突变而造成缺失 *Fmr1* 蛋白的 FXS 模型,目前该模型已被广泛用于 FXS 和孤独症的研究中^[11]。*Fmr1* KO 与野生型(WT)小鼠在肠道微生物群落的结构及多样性方面存在明显差异,本课题组前期的研究并首次报道使用脆弱拟杆菌 BF839 (BF839)可改善 *Fmr1* KO 小鼠的学习记忆能力及社交新奇偏好^[12-13]。本实验拟观察 BF839 是否能改善 *Fmr1* KO 鼠的焦虑和多动症状,为 FXS 和孤独症治疗提供参考。

1 对象与方法

1.1 实验动物及分组设计

Fmr1 KO 纯合子(-/-)及 WT 纯合子(+/+)FVB 近交系小鼠由 Oostra BA 教授惠赠(荷兰伊拉斯塔斯大学细胞生物学及遗传学研究中心)。所有小鼠繁育饲养于广州医科大学实验动物中心。本研究由广州医科大学附属第二医院实验动物伦理委员审批[SYXK(粤)2018-0192]。将 30 只 FVB 系 *Fmr1* KO 小鼠(3 周龄,雄性,体质量 11~13 g)按随机数字表法分为 *Fmr1* KO 组和 *Fmr1* KO+BF839 组($n=15$),*Fmr1* KO 组小鼠每天自由饮用高压灭菌自来水,*Fmr1* KO+BF839 组小鼠每天自由饮用 BF839 菌液(10 ml/d),另有 11 只野生型(WT)小鼠作为对照组(WT 组),每天自由饮用高压灭菌自来水,干预 4 周。小鼠满 7~8 周龄后开始进行行为学实验,实验时间为每天 9:00 到 16:00 之间进行,一共持续 7 d。以上所有实验小鼠为同窝小鼠,均经 PCR 基因型鉴定,具体鉴定方法参考文献[14]。

1.2 脆弱拟杆菌 BF839 来源和使用剂量

本实验所使用的脆弱拟杆菌 BF839 菌液(图腾益生液,沈阳新图腾),每支 25 ml,含脆活菌量 25×10^8 CFU。人体推荐量为每人 $200 \text{ ml} \cdot \text{d}^{-1} \cdot 60 \text{ kg}^{-1}$,相当于 $3.3 \text{ ml} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 益生菌原液。因而小鼠的剂量相当于人体推荐用量的 10 倍,即每天需摄入原液 33 ml/kg。本课题组根据前期临床治疗经验和小鼠预实验结果,预设给予 4 周的 15 倍高剂量原液(500 ml/kg),按每只小鼠平均体质量 20 g 计算约等于 $10 \text{ ml} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{只}^{-1}$ ^[18]。因此给予每笼 *Fmr1* KO+BF839 组小鼠(5 只),每天 2 支 BF839 菌液,估计每只小鼠平均每天摄入约 10 ml 菌液(活菌量 25×10^8 CFU)。

1.3 旷场实验评价 3 组小鼠无压力下的焦虑反应以及引发的运动行为

参考相关文献[14-15],采用旷场实验利用小

鼠对开阔新环境的先天躲避倾向,观察小鼠无压力下的焦虑反应以及引发的运动行为。旷场实验是用一个无盖正方形的分析箱,高度 30 cm,底边长 70 cm。实验开始先将小鼠放在分析箱的中央,让小鼠自由活动 5 min,同时用摄像头跟踪小鼠运动轨迹,观察小鼠在中央区域、周边区域的运动路程和停留时间,并用 SMART 软件(Smart v 2.5.21,西班牙 Panlab)记录分析,一共记录 5 min。每次 1 只小鼠,每次实验完成后将小鼠取出,将分析箱清理干净,喷洒酒精除去气味。

1.4 高架十字迷宫实验观察 3 组小鼠压力下的焦虑反应

参考相关文献[16-17],采用高架十字迷宫实验利用小鼠对新环境以及高悬敞开环境的恐惧心理,观察小鼠的压力下的焦虑样行为反应。高架十字迷宫仪器高 50 cm,十字迷宫组件两条相对开放臂(5 cm×60 cm)和两条相对闭合臂(5 cm×60 cm)及中央区(5 cm×5 cm)连接而成,接触而不反光。封闭臂两侧用挡板遮盖(15 cm 高),是闭合区域,开放臂则没有使用挡板遮盖,是敞开区域,迷宫内壁及其底部涂成黑色。将仔鼠放置于中央区域,并面朝敞开臂,开始计时。用摄像头跟踪小鼠运动轨迹,观察小鼠在进入开放臂和封闭臂的次数和比例以及停留时间,并用 SMART 软件记录分析,一共记录 5 min,每次 1 只小鼠,每次实验完成后将小鼠取下,将十字迷宫清理干净,使用酒精除味。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 20.0 进行数据分析。正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间差异的比较,采用 LSD-*t* 检验进一步两两比较;非正态分布的计量资料用中位数 [$M(Q_1, Q_3)$] 表示,采用 Kruskal-Wallis *H* 检验组间差异,采用 Nemenyi 检验进一步两两比较。

2 结果

2.1 旷场实验结果

BF839 能恢复 *Fmr1* KO 组小鼠在安全环境下的焦虑行为,还能改善安全环境下 *Fmr1* KO 组小鼠的多动行为。

在旷场实验中,*Fmr1* KO 组小鼠的总路程高于 WT 组小鼠 [$(9\ 852.19 \pm 1\ 994.97) \text{ cm}$ 比 $(4\ 335.07 \pm 1\ 332.97) \text{ cm}$, $P < 0.001$],BF839 降低了 *Fmr1* KO 小鼠(*Fmr1* KO+BF839 组)的总路程 [$(8\ 613.57 \pm 1\ 379.13)$

cm)($P=0.043$),但仍高于WT组小鼠($P<0.001$)。Fmr1 KO组小鼠的中央停留时间低于WT组[7.40(5.40, 14.20)s比12.60(5.60, 27.10)s, $P=0.396$],但差异无统计学意义,BF839则增加了Fmr1 KO小鼠(Fmr1 KO+BF839组)的中央停留时间[30.60(22.20, 38.50)s]($P<0.001$),也高于WT组小鼠($P=0.035$)。Fmr1 KO组小鼠的周边停留时间高于WT组[292.01(285.60, 293.40)s比279.50(263.40, 288.90)s, $P=0.088$],但差异无统计学意义,BF839则降低了Fmr1 KO小鼠(Fmr1 KO+BF839组)的周边停留时间[269.20(261.30, 277.60)s]($P<0.001$),且低于WT组,但差异无统计学意义($P=0.208$)。

2.2 高架十字迷宫实验结果

BF839能恢复Fmr1 KO组鼠在压力下的正常焦虑反应,但不能改善其在压力下的多动行为。Fmr1 KO组小鼠进入开放臂的次数比例高于WT组小鼠[48.08(42.86, 55.26)%比22.00(18.00, 40.00)%, $P=0.001$],BF839则降低了Fmr1 KO小鼠(Fmr1 KO+BF839组)的开放臂次数比例[31.03(26.47, 40.00)%, $P=0.002$],甚至高于WT组小鼠,但差异无统计学意义($P=1.000$)。Fmr1 KO组小鼠进入开放臂的时间比例明显高于WT组[48.62(34.85, 70.77)%比11.00(3.00, 34.00)%, $P=0.001$],BF839降低了Fmr1 KO小鼠(Fmr1 KO+BF839组)进入开放臂的时间比例[24.24(12.16, 38.82)%, $P=0.020$],甚至高于WT组小鼠,但差异无统计学意义($P=0.953$)。Fmr1 KO组小鼠进入臂的总次数高于WT组[40.00(34.00, 48.00)次比24.00(20.00, 28.00)次, $P=0.001$],BF839对Fmr1 KO小鼠(Fmr1 KO+BF839组)进入臂总次数无明显影响[41.00(30.00, 58.00)次, $P=0.921$],仍高于WT组小鼠($P=0.001$)。

3 讨论

旷场实验是公认用于测量动物焦虑行为,探索行为以及运动行为的经典试验,由于小鼠在陌生安全环境中,通常会喜欢在该环境的边缘区域活动,这一特性称趋触性,但动物的探究特性又促使其探索中央区域,如果在固定的时间内,中央和周围停留时间的比例越高,则说明该小鼠的探索性增加,焦虑性下降^[19,20]。小鼠的总路程一般反映了它自发水平的运动活动,路程越多,多动行为可能越明显。我们的研究发现在旷场试验中,Fmr1 KO组小鼠的总路程显著高于WT组小鼠,中央和周围停留时间

比例低于WT组小鼠,符合人类FXS的多动和焦虑的表现,BF839降低了Fmr1 KO组小鼠的总路程以及显著增加了它的中央和周围停留时间比例,说明它能纠正其焦虑行为,改善安全环境下的多动行为。这与既往研究发现脆弱拟杆菌9343能增加孤独症模型小鼠在旷场试验中的中央停留时间,从而推断其能改善焦虑样行为一致^[21]。

高架十字迷宫实验是普遍认可的评价焦虑动物模型的常用方法^[22]。进入臂(封闭臂+开放臂)的总次数一般反应了小鼠的活跃性,次数越高说明越活跃,过高则提示小鼠有多动的行为。本研究中Fmr1 KO组小鼠进入臂的总次数显著高于WT组小鼠,符合人类FXS多动的表现,BF839则不能减少进入臂的总次数,说明不影响其在危险环境下的多动行为。由于对高处的害怕和焦虑,正常小鼠一般会回避两个开放的敞开臂,喜欢活动在两个封闭的、安全的封闭臂端。然而对新环境的好奇和探索冲动,又会驱使小鼠尝试进入开放的臂端。进入开放臂次数和时间比例越高,说明小鼠在压力情况下焦虑反应越轻,更愿意探索新事物。然而,对于有认知障碍的小鼠来说,它可能缺乏对危险环境的认知和正常的焦虑反应,也表现为开放臂次数和时间比例增高的情况,此时比例越高,则反映了患病小鼠越缺乏压力下的正常焦虑反应,这可能与其认知能力的降低,危险意识薄弱有关。如果某种措施能够降低开放臂次数和时间比例,则说明其改善了患病小鼠的压力依赖性焦虑反应,我们的研究显示Fmr1 KO组小鼠表现出明显的抗焦虑样行为(进入开放臂的次数和时间比例显著高于WT组),这与我们课题组既往发现的Fmr1 KO组小鼠在开放臂的时间更多,有明显的抗焦虑样行为一致^[24]。本次研究发现:BF839降低了Fmr1 KO组小鼠进入开放臂的时间比例,甚至还略高于WT组小鼠,说明它能恢复其在压力下的正常焦虑反应,这一结果优于既往报道的粪菌移植(FMT)不能改变Fmr1 KO组小鼠的抗焦虑样行为^[25]。我们认为这可能与BF839更显著地改善了Fmr1 KO组小鼠的认知功能有关,其机制有待进一步研究。

焦虑是大多数FXS患者的核心症状之一,且多伴有易激惹等症状。目前以选择性5-羟色胺再摄取抑制剂、苯二氮卓类药物等抗精神病药对症治疗为主,疗效欠佳且有诱发嗜睡、认知和记忆受损等不良反应,难以长期使用^[26,27]。而本研究结果发现使用BF839干预可有效改善Fmr1 KO小鼠的焦虑样及

多动行为,为治疗 FXS 患者的焦虑样行为且避免药物不良反应提供了参考。同时这一发现对我们使用肠道微生物可能会改善遗传性神经系统疾病的精神症状,提供了更多的证据,对于治疗其它原因导致的焦虑症状可能也有一定的借鉴意义。由于这是一个已上市的产品,未来我们可以迅速开展更多的临床研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 感谢荷兰伊拉斯塔斯大学细胞生物学及遗传学研究中心 Oostra BA 教授惠赠的实验小鼠

作者贡献声明 曾婷、林楚楚、邓宇虹:设计实验、统计分析、论文撰写;林键泓、肖枫:实验操作;尚鹤睿、陈盛强:研究指导、论文修改

参考文献

- [1] Bostrom C, Yau SY, Majaess N, et al. Hippocampal dysfunction and cognitive impairment in fragile X syndrome [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2016, 68: 563-574. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.06.033.
- [2] McLennan Y, Polussa J, Tassone F, et al. Fragile x syndrome [J]. *Curr Genomics*, 2011, 12(3): 216-24. DOI: 10.2174/138920211795677886.
- [3] Wadell PM, Hagerman RJ, Hessel DR. Fragile X syndrome: psychiatric manifestations, assessment and emerging therapies [J]. *Curr Psychiatry Rev*, 2013, 9(1): 53-58. DOI: 10.2174/157340013805289644.
- [4] Kazdoba TM, Leach PT, Silverman JL, et al. Modeling fragile X syndrome in the Fmr1 knockout mouse [J]. *Intractable Rare Dis Res*, 2014, 3(4): 118-33. DOI: 10.5582/iridr.2014.01024.
- [5] 马云, 李婉睿, 刘伊璇, 等. 脆性 X 综合征致病机理与治疗 [J]. *生命的化学*, 2020, 40(2): 192-197. DOI: 10.13488/j.smhx.20190402.
- [6] 廖缘, 曾晓玲, 杨婧. FMR1 基因在脆性 X 综合征诊断及治疗中的应用进展 [J]. *医学综述*, 2022, 28(12): 2476-2481. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2022.12.033.
- [7] Raspa M, Wheeler AC, Riley C. Public health literature review of Fragile X syndrome [J]. *Pediatrics*, 2017, 139(Suppl 3): S153-S171. DOI: 10.1542/peds.2016-1159C.
- [8] Góralezyk-Bińkowska A, Szmajda-Krygier D, Kozłowska E. The microbiota-gut-brain axis in psychiatric disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11245. DOI: 10.3390/ijms231911245.
- [9] Chernikova MA, Flores GD, Kilroy E, et al. The brain-gut-microbiome system: pathways and implications for autism spectrum disorder [J]. *Nutrients*, 2021, 13(12): 4497. DOI: 10.3390/nu13124497.
- [10] Lach G, Schellekens H, Dinan TG, et al. Anxiety, depression, and the microbiome: a role for gut peptides [J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(1): 36-59. DOI: 10.1007/s13311-017-0585-0.
- [11] Bernardet M, Crusio WE. Fmr1 KO mice as a possible model of autistic feature [J]. *Scientific World Journal*, 2006, 6: 1164-1176. DOI: 10.1100/tsw.2006.220.
- [12] 欧阳颖仪, 陈盛强, 田丽如, 等. Fmr1 基因敲除型小鼠肠道菌群结构分析 [J]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2020, 8(3): 158-165. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-5820.2020.03.007.
- [13] 林楚楚, 曾婷, 林键泓, 等. 脆弱拟杆菌 BF839 可改善 Fmr1 KO 小鼠的学习记忆能力及社交新奇偏好能力 [J]. *中华神经医学杂志*, 2022, 21(4): 341-347. DOI: 10.3760/cma.j.cn115354-20211220-00835.
- [14] 邢州, 孙卫文, 黄越玲, 等. 30 日龄 FMR1 基因敲除小鼠的旷场行为观察 [J]. *解剖学研究*, 2009, (2): 109-113.
- [15] Mineur YS, Sluyter F, Wit S D, et al. Behavioral and neuroanatomical characterization of the Fmr1 knockout mouse [J]. *Hippocampus*, 2002, 12(1): 39-46. DOI: 10.1002/hipo.10005.
- [16] Sturman O, Germain PL, Bohacek J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test [J]. *Stress*, 2018, 21(5): 443-452. DOI: 10.1080/10253890.2018.1438405.
- [17] Luo CW, Deng XY, Cheng JL, et al. Altered anxiety and social behaviors in a mouse model of Fragile X syndrome treated with hyperbaric oxygen therapy [J]. *J Clin Neurosci*, 2020, 73: 245-251. DOI: 10.1016/j.jocn.2020.02.004.
- [18] Tanaka K. Determining of operating condition for the open field test under nonclinical fertility study [J]. *J Teratol*, 1983, 23: 145-155. DOI: 10.24540/egafa.23.1_145.
- [19] Paré WP. Open field, learned helplessness, conditioned defensive burying, and forced-swim tests in WKY rats [J]. *Physiol Behav*, 1994, 55(3): 433-439. DOI: 10.1016/0031-9384(94)90097-3.
- [20] Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice [J]. *J Vis Exp*, 2015, (96): e52434. DOI: 10.3791/52434.PMID: 25742564.
- [21] Kraeuter AK, Guest PC, Samyay Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 99-103. DOI: 10.1007/978-1-4939-8994-2_9.
- [22] Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders [J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1451-63. DOI: 10.1016/j.cell.2013.11.024.
- [23] Pellow S, Chopin P, File SE, et al. Validation of open; closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat [J]. *J Neurosci Methods*, 1985, 14(3): 149-167. DOI: 10.1016/0165-0270(85)90031-7.
- [24] 刘国斌, 孙卫文, 沈岩松, 等. 4 周龄 Fmr1 基因敲除小鼠的高架十字迷宫行为观察 [J]. *现代医院*, 2011, 11(12): 12-14. DOI: 10.3969/j.issn.1671-332X.2011.12.006.
- [25] Goo N, Bae HJ, Park K, et al. The effect of fecal microbiota transplantation on autistic-like behaviors in Fmr1 KO mice [J]. *Life Sci*, 2020, 262: 118497. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118497.
- [26] Argyropoulos SV, Sandford JJ, Nutt DJ. The psychobiology of

- anxiolytic drug. Part 2: Pharmacological treatments of anxiety [J]. *Pharmacol Ther*, 2000, 88(3): 213-27. DOI: 10.1016/S0163-7258(00)00083-8.
- [27] Belebony R, Pizzo AB, Fontana AG, et al. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 493(1-3): 1-17. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.03.049.
- [28] 郑天歌, 张青杰, 贾靖仪, 等. 新型抗焦虑药物研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(9): 1188-1196. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2021.09.002.
- [29] Crowe SF, Stranks EK. The residual medium and long-term cognitive effects of Benzodiazepine use: an updated meta-analysis [J]. *Arch Clin Neuropsychol*, 2018, 33(7): 901-911. DOI: 10.1093/arclin/aex120.
- [30] Thibaut F. Anxiety disorders: a review of current literature [J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2017, 19(2): 87-88. DOI: 10.31887/DCNS.2017.19.2/thibaut.

(收稿日期:2023-03-13)

(本文编辑:刘新艳)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于论文写作中的作者署名与致谢

我国著作权法公布以来,已得到社会各界的广泛重视,作为医学科技期刊必须不折不扣地执行著作权法。为此将本刊对作者署名和致谢的有关要求重申如下。

1 作者署名的意义和应具备的条件

1.1 署名的意义

(1)标明论文的责任人,文责自负。(2)医学论文是医学科技成果的总结和记录;是作者辛勤劳动的成果和创造智慧的结晶;也是作者对医学事业做出的贡献,并以此获得社会的尊重和承认的客观指标;是应得的荣誉;也是论文版权归作者的一个声明。(3)作者署名便于编辑、读者与作者联系,沟通信息,互相探讨,共同提高。作者姓名在文题下按序排列,排序应在投稿时确定,在编排过程中不应再做更改;作者单位名称及邮政编码脚注于同页左下方。

1.2 作者应具备下列条件

(1)参与选题和设计,或参与资料的分析和解释者。(2)起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容者。(3)能对编辑部的修改意见进行核修,在学术界进行答辩,并最终同意该文发表者。以上3条均需具备。仅参与获得资金或收集资料者不能列为作者,仅对科研小组进行一般管理者也不宜列为作者。其他对该研究有贡献者应列入致谢部分。对文章中的各主要结论,均必须至少有1位作者负责。在每篇文章的作者中需要确定1位能对该论文全面负责的通信作者。通信作者应在投稿时确定,如在来稿中未特殊标明,则视第1作者为通信作者。第1作者与通信作者不是同一人时,在论文首页脚注通信作者姓名、单位及邮政编码。作者中如有外籍作者,应附本人亲笔签名同意在本刊发表的函件。集体署名的论文于文题下列署各单位,于文末列整理者姓名,并于论文首页脚注通信作者姓名、单位和邮政编码。集体署名的文章必须将对该文负责的关键人物列为通信作者。通信作者只列1位,由投稿者决定。

原则上1位作者仅能标注1个单位(著录个人隶属的行政机构,如果作者隶属的行政机构与完成课题选题、研究方案设计、进行研究工作并提供研究条件的机构不一致,或作者隶属不同机构时,以提供研究条件和完成研究工作的机构为作者单位),确需标注多个单位的,需在投稿介绍信加盖所有著录单位的公章(所有公章盖在同一张纸上),且第1作者单位必须为资料来源单位。如确需列出两位及以上的同等级贡献者(并列第1作者),这些作者均不能来自同一单位,必须不同单位才能标注。著录格式为在作者单位下方另起一行著录“××和××对本文有同等贡献”,英文为“×× and ×× are contributed equally to the article”。通信作者一般只列1位,由投稿者确定。对给予实质性帮助但不符合作者条件的单位或个人可在文后给予致谢,但必须征得致谢人的书面同意。

2 致谢

在文后致谢是表示感谢并记录在案的意思。对给予实质性帮助而又不能列为作者的单位或个人应在文后给予致谢。但必须征得被致谢人的书面同意。致谢应避免以下倾向:(1)对确实给予了帮助的单位或个人,甚至用了他人的方法、思路、资料,为了抢先发表,而不公开致谢和说明。(2)出于某种考虑,将被致谢人放在作者的位置上,混淆了作者和被致谢者的权利和义务。(3)以名人、知名专家包装自己的论文,抬高论文的身份,将未曾参与工作的,也未阅读过该论文的知名专家写在被致谢中。被致谢者包括:(1)对研究提供资助的单位和个人、合作单位。(2)协助完成研究工作和提供便利条件的组织和个人。(3)协助诊断和提出重要建议的人。(4)给予转载和引用权的资料、图片、文献、研究思想和设想的所有者。(5)做出贡献又不能成为作者的人,如提供技术帮助和给予财力、物力支持的人,阐明其支援的性质。(6)其他需致谢者。