

·基础研究·

基于“心与小肠相表里”探讨阿尔茨海默病小鼠全肠道菌群移植对回肠肠道微环境的影响

熊伟, 胡林, 许青, 李熙, 丁贤, 窦重阳, 陈芳芳, 闫智勇
(西南交通大学生命科学与工程学院, 四川成都 610031)

摘要:【目的】在“心与小肠相表里”中医理论指导下,探讨阿尔茨海默病(AD)模型小鼠全肠道菌群移植,是否对正常小鼠回肠肠道微环境的影响更显著。【方法】将14只6月龄无特定病原体的雄性APP/PS1双转基因AD模型小鼠的全肠道菌群,移植至6只混合抗生素处理过的同年龄同背景正常C57BL/6J小鼠肠道内,移植14 d后再定殖14 d,观察小鼠回肠和结肠组织病理变化,并采用16S核糖体RNA(16S rRNA)基因测序技术分析小鼠回肠和结肠菌群。【结果】AD小鼠全肠道菌群移植到正常小鼠后,病理分析表明仅回肠组织出现粘膜层破坏和隐窝腺上皮细胞变性、坏死脱落;测序分析发现,仅回肠菌群的种类数量($P<0.01$)、Chao1指数($P<0.01$)和Simpson指数($P<0.01$)降低且菌群组成和AD模型小鼠更相似。【结论】AD模型小鼠全肠道菌群移植对正常小鼠回肠菌群多样性及组成的影响显著高于结肠菌群,同时导致回肠粘膜的病理损伤,表明回肠肠道微环境可能和AD的发生发展关系更加密切,与“心与小肠相表里”中医理论高度切合。

关键词: 中医理论;阿尔茨海默病;全肠道菌群移植;回肠肠道微环境;结肠肠道微环境

中图分类号:R229 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2023)01-0063-08

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0109

Probing the Impact of Whole Intestinal Microbiota Transplantation from Alzheimer's Disease Model Mice on the Ileal Microenvironment Based on the "Interior-Exterior Relationship Exists Between Heart and Small Intestine"

XIONG Wei, HU Ling, XU Qing, LI Xi, DING Xian, DOU Chong-yang,
CHENG Fang-fang, YAN Zhi-yong

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Correspondence to: YAN Zhi-yong; E-mail: yzhiy@swjtu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate whether the whole intestinal microbiota transplantation in Alzheimer's disease (AD) model mice has more significant effects on ileum intestinal microenvironment in normal mice under the guidance of the theory of traditional Chinese medicine that "interior-exterior relationship exists between the heart and small intestine".【Methods】The whole intestinal microbiota of fourteen 6-month-old specific pathogen free male APP/PS1 double-transgenic AD model mice was transplanted into the gut of six normal C57BL/6J mice of the same age and background treated with mixed antibiotics for 14 days. Then, after 14 days of normal rearing, the mice were sacrificed. Next, the pathological changes in the ileum and colon were observed, and the composition and diversity of the ileal and colonic microbiota was analyzed by sequencing.【Results】After the whole intestinal microbiota of AD mice was transplanted into normal mice, patho-

收稿日期:2022-10-14

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(2682020ZT81);四川省中医药管理局中医药科研专项(2021MS099);成都市科技局技术创新研发项目(2021-YF05-02379-SN)

作者简介:熊伟,硕士生,研究方向:中药药理学,E-mail: wei_xiong@my.swjtu.edu.cn;闫智勇,通信作者,教授,研究方向:中药药理学,E-mail: yzhiy@swjtu.edu.cn

logical analysis showed that only the ileum tissue had mucosal damage and crypt gland epithelial cell degeneration, necrosis, and shedding. Moreover, the microbiota analysis found that only the number of genera ($P<0.01$), Chao1 index ($P<0.01$) and Simpson index of ileal microbiota in normal mice decreased ($P<0.01$), and the composition of intestinal microbiota was quite similar to that of AD model mice.【Conclusion】 Under the effect of whole gut microbiota transplantation in AD mice, the diversity and composition of ileal microbiota change more than that of colonic microbiota in normal mice, and at the same time, it results in pathological damage to the ileal mucosa, indicating that the ileal microenvironment may be more closely related to the occurrence and development of AD, which is highly consistent with the traditional Chinese medicine theory of "interior-exterior relationship between heart and small intestine".

Key words: traditional Chinese medicine theory; Alzheimer's disease; whole intestinal microbiota transplantation; ileal microenvironment; colonic microenvironment

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2023, 44(1): 63-70]

中医理论认为人体脏腑有表里相合的关系,使人体成为一个有机整体。“心与小肠相表里”是中医藏象基本理论之一,指出心与小肠通过经脉相互络属,互为表里,二者在生理和病理上相互作用、相互影响^[1]。心的主要生理功能包括主血脉和主藏神两方面,正如《医学入门·心》所说“有血肉之心……有神明之心。”心藏神体现了心主宰意识、思维、情志等精神活动的功能,因此“心与小肠相表里”理论指明了神志病症如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等的病因病机和小肠之间的密切相关性。AD是一种常见的神经退行性疾病,临床表现通常由最初的记忆功能衰退发展为语言障碍和定向障碍等行为问题,逐渐丧失机体功能,最终导致死亡,迄今为止,其真实病理机制仍不清楚^[2]。尽管AD一直是医学界研究的重点,但其病因和发病机制尚不十分清楚,发病假说涉及 β 淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)沉积、神经炎症和Tau蛋白过度磷酸化等,同时,中枢和肠道微环境交互作用失调在AD发生发展中起重要作用^[3]。肠道微环境指以肠粘膜上皮细胞、肠道菌群及其代谢产物、宿主代谢物以及食物残余物等组成的动态稳定内环境,是肠道微环境的主要组成部分^[4]。大量的动物模型和临床数据表明正常和疾病机体的肠道菌群有差异,且参与AD的发生和发展^[3]。值得关注的是,通过菌群移植探讨肠道菌群和AD相互作用的研究虽较为丰富,但多是基于对大肠菌群(盲肠和结肠)为主的研究,而鲜有针对小肠菌群(空肠和回肠)的探讨^[5-6]。粪便菌群移植(fecal microbiota transplantation, FMT)作为菌群移植常用的方法,是将供体的肠道菌群转移并定植到受体,从而改变受体肠道菌群的组成和功能^[7]。传统FMT常用粪便菌群,其组成和功能和大肠菌群类似,但不同肠段的肠道菌群组成及功能不同^[8],比如小肠是营养物质消化、吸收的主要场所,聚居在其中的微生物在多样性和丰度方面与大肠有着一定的差异,有不容忽视的功能^[9-10]。我们前期采用双侧脑室注射A β_{1-42} 的方法建立了AD大鼠模型,对比了模型大鼠回肠和结肠的菌群变化,发现了AD大鼠的回肠菌群变化更加明显^[11],且中药复方七圣丸可通过调节大鼠回肠菌群结构及相对丰度,减轻中枢

神经炎症反应,降低中枢A β_{1-42} 沉积起到抗AD作用^[12]。基于此,本文从回肠菌群对AD发生发展影响的角度,探讨AD模型小鼠全肠道菌群移植对正常小鼠回肠肠道微环境的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

20只6月龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)雄性APP/PS1双转基因小鼠和12只同月龄同背景野生型C57BL/6J小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证编号为SCXK(京)2019-0008。所有的动物体质量为32~34 g,被饲养于四川省科学院//四川省人民医院实验动物研究所,饲养环境为SPF级,温度为(22±2)°C,相对湿度为(50±10)% ,明暗周期为12 h/12 h,允许动物自由饮食饮水。整个实验阶段均严格地按照卫生部颁布的《医学实验动物管理实施细则》(1988年)进行。并且本研究已通过西南交通大学动物伦理委员会批准,批准编号为:SWJTU-2001-001。

1.2 主要试剂

氨苄西林胶囊(批号HC20140024)购自联邦制药厂有限公司;甲硝唑片(批号国药准字H42020388)购自华中药业股份有限公司;硫酸庆大霉素片(批号H50021076)购自重庆迪康长江制药有限公司;罗红霉素分散片(批号国药准字H19980087)购自哈药集团制药六厂;16S Barcoding试剂盒(批号SQK-RAB204)、Ligation Sequencing试剂盒(批号SQK-LSK109)、Flow Cell Priming试剂盒(批号EXP-FLP002)和MinION Flow Cell(批号R9.4)购自美国Nanopore公司。

1.3 主要仪器

RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);Eclipse Ci-L型正置白光拍照显微镜(日本Nikon);多功能酶标仪(厂家Tecan,型号F200);荧光定量仪(厂家Applied

Biosystems, 型号 9700); 测序仪(厂家 Nanopore, 型号 GridION)。

1.4 全肠道菌群移植液的制备

在Li等人的基础上^[6], 无菌条件下, 收集APP/PS1小鼠全肠道内容物(空肠、回肠、盲肠和结肠), 混合, 每0.2 g肠道内容物溶解于5 mL生理盐水中, 在3 000 r/min($r=6$ cm)、4 °C条件下离心15 min, 取上清液, 即得(移植前1 h内制备)。

1.5 抗生素混合液的制备

在文献报道的基础上^[13], 使用生理盐水配制广谱抗生素混合液—精密称取20 mg 氨基青霉素、20 mg 甲硝唑、2 mg 庆大霉素和0.2 mg 罗红霉素于20 mL容量瓶中, 室温下定容至刻度线, 即得, 于4 °C条件下保存。

1.6 动物分组、抗生素的给与和全肠道菌群的移植

适应性饲养3 d后, 将所有小鼠分为4组: ①正常组: 6只C57BL/6J小鼠; ②模型组: 6只APP/PS1双转基因小鼠; ③全肠道菌群移植组: 6只C57BL/6J小鼠; ④AD小鼠全肠道菌群供体组: 14只APP/PS1双转基因小鼠。全肠道菌群移植组小鼠在适应性饲养后先进行为期7 d的抗生素处理, 末次抗生素处理后, 间隔2 d, 每天灌胃0.2全肠道菌群移植液, 每天一次, 连续14 d。模型组与正常组均同一时间, 灌胃等体积生理盐水。移植结束后再正常饲养14 d, 期间无任何操作, 所有小鼠均自由饮食。

1.7 样品收集与处理

定植结束后, 取1~2 cm回肠和结肠组织于40 g/L多聚甲醛中固定24 h。同时, 采集适量回肠和结肠内容物置于无菌冻存管中, -80 °C下冻存。

1.8 苏木素-伊红染色观察小鼠回肠和结肠病理改变

将样本脱水、包埋、切片和染色后观察各组动物回肠与结肠的组织病理情况。

1.9 肠道菌群测序分析

根据文献^[12]的报道, 从正常组、模型组和全肠道菌群移植组中分别随机挑选4个样本进行测序。

1.10 统计方法

实验结果均采用IBM SPSS Statistics 22软件进行统计分析。三组定量资料如符合正态分布且方差齐, 则采用单因素方差分析进行统计学分析, 以最小显著性差异(Least significant difference, LSD)进行事后多重比较; 三组定量资料若符合正态分布且方差不齐, 则采用韦尔奇(Welch)单因素方差分析进行统计学分析, 以盖姆斯-豪厄尔(Games-Howell)进行事后多重比较; 三组定量资料若不符合正态分布, 则采用克鲁斯卡尔-沃利斯(Kruskal Wallis H)进行统计学分析。定量资料符合正态分布的用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 不符合正态分布的按中位数 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 全肠道菌群移植对正常小鼠回肠组织病理学的影响

如图1所示, 正常组小鼠回肠结构完整, 未见明显病理损伤; 模型组小鼠回肠可见粘膜层组织结构不完整, 肠道绒毛顶部细胞脱落, 脱落细胞核形态较清晰(红色箭头标识); 全肠道菌群移植组同样可见回肠粘膜层组织结构破坏, 隐窝腺上皮细胞变性、坏死脱落(红色箭头标识)。对结肠而言, 正常组小鼠结肠组织组织结构完整, 未见明显病理损伤; 模型组小鼠部分固有层结构破坏(红色箭头标识); 菌群移植组未见明显病理损伤。

2.2 全肠道菌群移植对正常小鼠回肠和结肠菌属的影响

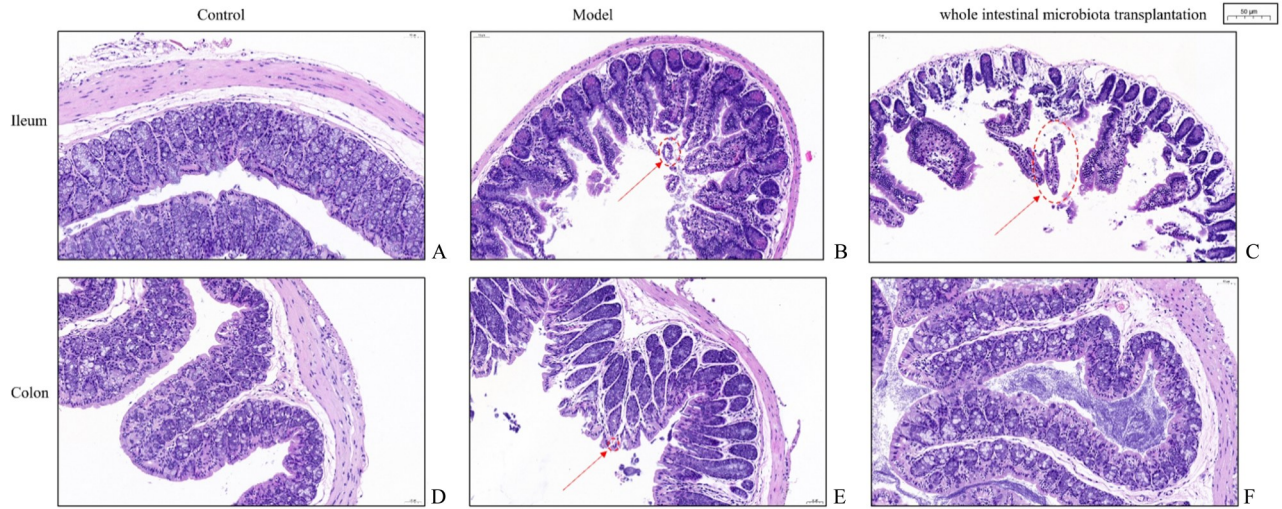
从表1可知, 在正常组、模型组和全肠道菌群移植组的回肠菌群中分别鉴定到约154个、96个和104个属, 其中模型组、全肠道菌群移植组的回肠菌群种类数量和正常组相比均显著下降($P < 0.01$), 但模型组和全肠道菌群移植组之间回肠菌群种类数量差异无统计学意义($P > 0.05$)。同时在正常组、模型组和全肠道菌群移植组的结肠菌群中分别鉴定到190个、178个和168个结肠菌属, 三组结肠菌群种类数量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 全肠道菌群移植对正常小鼠回肠和结肠菌群 α -多样性影响

分析回肠和结肠菌群 α -多样性发现(表2), 和正常组相比, 模型组和全肠道菌群移植组回肠菌群的Chao1指数下降, 差异具有统计学意义($P < 0.01$), 且二者回肠菌群Chao1指数之间的差距无统计学意义($P > 0.05$)。就结肠菌群Chao1指数而言, 正常组、模型组和全肠道菌群移植组之间的差距无统计学意义($P > 0.05$)。就回肠菌群的Simpson指数而言, 模型组和全肠道菌群移植组均低于正常组, 此差异有统计学意义($P < 0.01$); 并且, 和模型组相比, 全肠道菌群移植组回肠菌群的Simpson指数之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。就结肠菌群的Simpson指数而言, 正常组、模型组和全肠道菌群移植组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 全肠道菌群移植对正常小鼠回肠和结肠菌群 β -多样性影响

就回肠菌群而言(图2A, 表3), 正常组回肠菌群主要聚集在(-0.197, 0.0107)附近, 模型组回肠菌群主要聚集在(0.108, -0.0117)附近, 全肠道菌群移植组回肠菌群主要聚集在(0.089, 0.000)附近。在主坐标轴1(横坐标, PC1)上, 和正常组比较, 模型组($P=0.043$)和全肠道菌群移植组($P=0.049$)的回肠菌群位置的偏移具有意义($P < 0.05$)。且全肠道菌群移植组和模型组的回肠菌群位置差异无统计学意义($P=0.329 > 0.05$)。在主坐标轴2上(纵坐标, PC2), 正常组、



Red arrows and circles indicate pathological changes (scaleplate: 50 μm). A: Ileum of mice in control group; B: Ileum of mice in model group; C: Ileum of mice in whole intestinal microbiota transplantation (WIMT) group; D: Colon of mice in control group; E: Colon of mice in model group; F: Colon of mice in WIMT group.

图1 HE染色观察小鼠回肠和结肠组织病理改变

Fig. 1 Pathological changes of ileum and colon in mice observed through HE staining

表1 小鼠回肠和结肠菌属数量

Table 1 Number of microbiota genus in mice ileum and colon ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Groups	Ileac genus	Colonic genus
Control	154 \pm 23	190 \pm 19
Model	96 \pm 12 ²⁾	178 \pm 10
WIMT	104 \pm 22 ²⁾	168 \pm 19
<i>F</i>	10.075	1.809
<i>P</i>	0.005	0.219

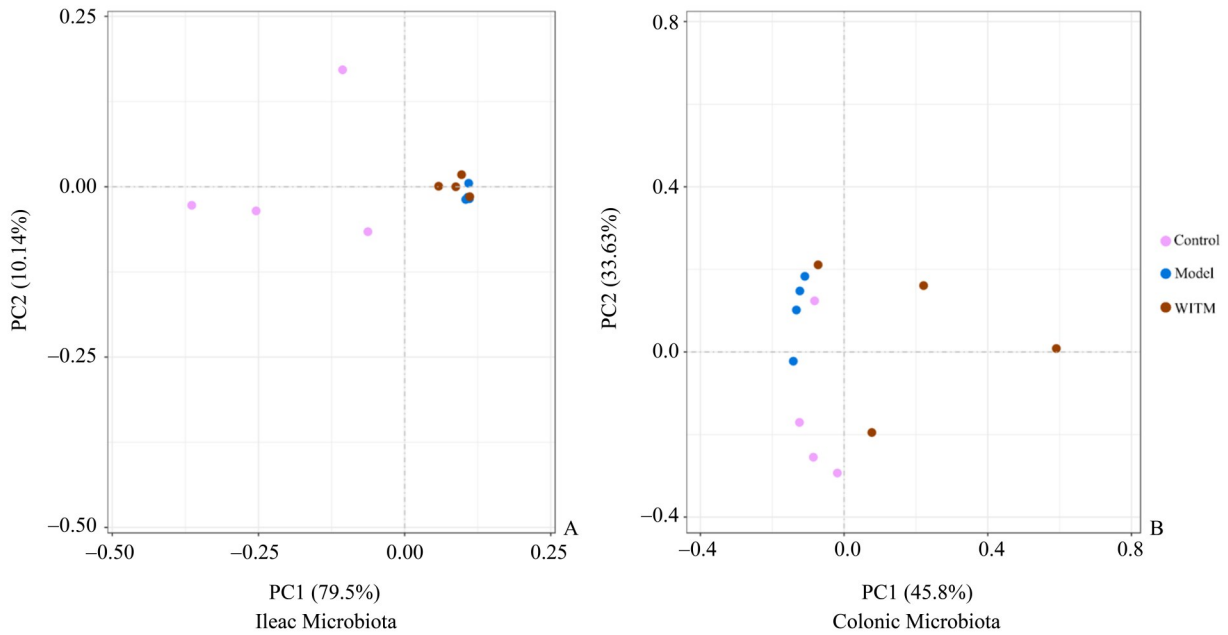
WIMT: Whole Intestinal Microbiota Transplantation; Comparison among multiple samples was performed using Fisher's one-way analysis of variance (ANOVA), followed by least significant difference (LSD) for post hoc test. ¹⁾ compared with control, $P < 0.05$; ²⁾ compared with control, $P < 0.01$.

表2 各组回肠和结肠菌群的 α -多样性指数

Table 2 α -diversity index of ileac and colonic microbiota in each group ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Groups	Ileum		Colon	
	Chao1 index	Simpson index	Chao1 index	Simpson index
Control	507 \pm 66	0.914 \pm 0.025	600 \pm 59	0.970 \pm 0.011
Model	355 \pm 37 ²⁾	0.856 \pm 0.005 ²⁾	609 \pm 78	0.950 \pm 0.013
WIMT	383 \pm 47 ²⁾	0.863 \pm 0.005 ²⁾	556 \pm 51	0.916 \pm 0.060
<i>F</i>	9.912	16.899	0.803	2.352
<i>P</i>	0.005	0.001	0.478	0.151

WIMT: Whole Intestinal Microbiota Transplantation; Larger Chao1 index means more community species. A higher Simpson index indicates a higher diversity. Comparison among multiple samples was performed using Fisher's ANOVA, followed by LSD for post hoc test. ¹⁾ compared with control, $P < 0.05$; ²⁾ compared with control, $P < 0.01$.



WIMT: Whole Intestinal Microbiota Transplantation; A: Principal coordinate analysis (PCoA) of ileac microbiota; B: PCoA analysis of colonic microbiota.

图2 各组肠道菌群主坐标分析(PCoA)结果

Fig. 2 Results of principal coordinate analysis (PCoA) of intestinal microbiota in each group

模型组和全肠道菌群移植组的回肠菌群位置差异无统计学意义($P>0.05$)。就结肠菌群而言(图 2B,表 3),正常组结肠菌群主要聚集在(-0.078,-0.149)附近,模型组结肠菌群主要聚集在(-0.127,0.103),全肠道菌群移植组结肠菌群主要

聚集在(0.204,0.046)附近。在主坐标轴 2 上,无论在主坐标轴 1 还是主坐标轴 2 上,三组结肠菌群之间的位置差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 各组肠道菌群主坐标

Table 3 Principal coordinate of intestinal microbiota in each group

$[\bar{x} \pm s, M(P_{25} \sim P_{75}), n=4]$

Groups	Ileum		Colon	
	PC1	PC2	PC1	PC2
Control	-0.197±0.138	-0.031 (-0.058~-0.122)	-0.078±0.044	-0.149±0.189
Model	0.108±0.003 ²⁾	-0.017 (-0.018~-0.000)	-0.127±0.014	0.103±0.090
WIMT	0.089±0.023 ²⁾	0.000 (-0.011~-0.013)	0.204±0.284	0.046±0.182
F/H	9.598	2.808	4.268	2.710
P	0.029	0.246	0.094	0.120

WIMT: Whole Intestinal Microbiota Transplantation; PC: Principal coordinate; Ileum PC1: 79.50%; Ileum PC2: 10.14%; Colon PC1: 45.80%; Colon PC2: 33.63%; Percentage represents the contribution value of the principal coordinate to the sample difference. "Ileum PC1" and "Colon PC1" were performed using Welch's ANOVA, followed by Games-Howell for post hoc test. "Ileum PC2" was performed using Kruskal-Wallis H test. "Colon PC2" was performed using Fisher's ANOVA, followed by LSD for post hoc test. ²⁾ compared with control, $P<0.01$.

2.5 全肠道菌群移植对正常小鼠回肠菌群组成影响

具体而言(表 4),正常组回肠菌群相对丰度排名前三的分别是假单胞菌属(*Pseudomonas*, 63.26%)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*, 8.90%)和穆里巴库鲁姆菌属(*Muribaculum*,

5.80%)。它们在模型组回肠菌群中,相对丰度分别为 86.25%、2.63% 和 0.05%;在全肠道菌群移植组回肠菌群中,相对丰度分别为 85.58%、0.45% 和 1.28%。和正常组回肠菌群相比,在模型组中,假单胞菌属的相对丰度上升,具有统

计学意义($P<0.01$),乳酸杆菌属和穆里巴库鲁姆菌属的相对丰度下降,具有统计学意义($P<0.01$);在全肠道菌群移植组中,假单胞菌属相对丰度增加,具有统计学意义($P<0.01$),乳酸杆菌属和穆里巴库鲁姆菌属相对丰度下降,具有统计学意义($P<0.01$)。和模型组回肠菌群比较,在全肠道菌群移植组中,假单胞菌属、乳酸杆菌属和穆里巴库鲁姆菌属的相对丰度均无统计学意义($P>0.05$)。

2.6 全肠道菌群移植对正常小鼠结肠菌群组成影响

由表5可知,正常组结肠菌群相对丰度排名前三的菌属分别是假单胞菌属(16.63%)、穆里巴库鲁姆菌属(8.79%)和拟杆菌属(*Bacteroides*, 8.02%)。它们在模型组结肠菌群中,相对丰度分别为13.52%、18.15%和10.00%;在全肠道菌群移植组结肠菌群中,相对丰度分别为24.89%、12.42%和7.36%。和正常组结肠菌群比较,在模型组 and 全肠道菌群移植组中,假单胞菌属、穆里巴库鲁姆菌属和拟杆菌属的相对丰度无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 结果分析

中医脏腑存在阴阳表里相合的关系,心与小肠通过经

脉相互络属,手少阴经属心络小肠,手太阳经属小肠络心,两者一脏一腑,一阴一阳,一表一里,相互配合,功能上相互协调,病理上相互影响。中枢和包括肠道菌群在内的肠道微环境存在双向信号调节系统,二者通过自主神经系统、神经内分泌系统、免疫系统等交互调控,在人体生理病理中发挥重要作用^[14]。在情志方面,其将大脑的情感、认知与肠道功能密切联系起来^[15],肠道微环境影响着人类的肠神经系统和中枢神经系统的发育^[16]和功能,如情绪反应^[17-18]、认知和学习能力^[19]等,并且和AD等中枢神经系统疾病发生发展密切相关^[3]。因此,现代关于中枢和肠道微环境的互作研究,与“心与小肠相表里”理论在“心主神明”角度具有很好切合性,为进一步阐释和挖掘“心与小肠相表里”理论提供了可行的切入点。

原核微生物的16S rRNA能够用于微生物的分类鉴定和系统发育研究,被广泛应用于微生物生态学研究^[20]。本研究采用NanoPore三代测序技术的扩增子测序,具有高通量和高读长等优点,目前已成为研究环境微生物群落组成和多样性的前沿方法。NanoPore三代测序技术描绘了正常小鼠、AD小鼠和AD全肠道菌群移植小鼠的回肠、结肠菌群轮廓。AD模型小鼠全肠道菌群移植到正常小鼠肠道内后,发现正常小鼠回肠菌群的种类数量发生显著改变,而其结肠菌群的种类数量无显著变化,这与AD小鼠回肠和结肠

表4 回肠菌群中相对丰度排名前三的优势菌属

Table 4 The ileac microbiota ranked the top three microbiota in relative abundance ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Groups	<i>Pseudomonas</i> /%	<i>Lactobacillus</i> /%	<i>Muribaculum</i> /%
Control	63.26±12.15	8.90±4.48	5.80±3.74
Model	86.25±1.33 ¹⁾	2.63±1.65 ¹⁾	0.05±0.05 ¹⁾
WIMT	85.58±2.58 ¹⁾	0.45±0.15 ¹⁾	1.28±1.35 ¹⁾
<i>F</i>	8.04	15.31	12.62
<i>P</i>	0.03	0.01	0.02

WIMT: Whole Intestinal Microbiota Transplantation; Comparison among multiple samples was performed using Welch's ANOVA, followed by Games-Howell for post hoc test.¹⁾ compared with control, $P<0.05$.

表5 正常小鼠结肠菌群相对丰度排名前三优势菌属

Table 5 The colonic microbiota ranked the top three microbiota in relative abundance [$\bar{x} \pm s/M (P_{25} \sim P_{75}), n=4$]

Groups	<i>Pseudomonas</i> /%	<i>Muribaculum</i> /%	<i>Bacteroides</i> /%
Control	16.63±3.04	0.06(0.05~0.15)	8.02±4.60
Model	13.52±1.30	0.19(0.15~0.20)	10.00±2.23
WIMT	24.89±6.36	0.11(0.03~0.23)	7.36±5.83
<i>F/H</i>	6.51	3.96	0.38
<i>P</i>	0.04	0.14	0.70

WIMT: Whole Intestinal Microbiota Transplantation; "*Pseudomonas*" was performed using Welch's ANOVA, followed by Games-Howell for post hoc test. "*Muribaculum*" was performed using Kruskal Wallis *H* test. "*Bacteroides*" was performed using Fisher's ANOVA, followed by LSD for post hoc test.

种类数量的变化趋势一致。

在群落生态学的研究中,多样性包括了 α -多样性和 β -多样性等— α -多样性用来表征样本的物种丰富程度; β -多样性则用来表征样本间的变异,其关注点在样本间的差别上^[21]。就肠道菌群多样性变化而言,将AD模型小鼠全肠道菌群移植到正常小鼠肠道后,发现正常小鼠回肠菌群和结肠菌群的多样性均改变,且回肠菌群的多样性与AD小鼠更相似。这是目前研究中鲜有报道的。表明AD模型小鼠全肠道菌群移植可诱导正常小鼠回肠菌群出现AD样改变,而对结肠影响不明显。

在物种组成方面,假单胞菌属是正常组、模型组和全肠道菌群移植组回肠菌群中最丰富的菌属,这可能是由于其属于变形菌门(*Proteobacteria*),而变形菌门是回肠正常生理状态下较丰富的常驻菌门^[22]。AD模型小鼠的全肠道菌群被移植到正常小鼠肠道后,在回肠菌群中,假单胞菌属、乳酸杆菌属和穆里巴库鲁姆菌属的相对丰度均被显著影响,且这与它们在AD小鼠中的变化一致。同时研究发现,在AD患者或者模型动物中,假单胞菌属的相对丰度上升^[23]、乳酸杆菌属的相对丰度降低^[24]和穆里巴库鲁姆菌属的相对丰度降低^[25],这与我们的发现一致。其中,正常组小鼠回肠

菌群中富集的乳酸杆菌是肠道中的一种益生菌,其可以通过竞争上皮结合位点和养分来预防病原体的感染或定植,并产生一些抗菌素^[26]。邓爱萍等研究发现AD患者肠道菌群的紊乱由乳酸杆菌下降导致,其可与炎症因子相互作用,影响AD病情发展^[27]。此外,有研究表明穆里巴库鲁姆菌属参与肠道胆汁酸的转化^[28]。近期有报道指出胆汁酸或将成为新的AD生物标记物^[29]。然而,在模型组结肠菌群中,假单胞菌属和穆里巴库鲁姆菌属的相对丰度和正常组没有显著区别,因此,和结肠菌群比较,回肠菌群的改变可能更容易被观察到。

3.2 研究意义与不足

本研究首次将AD模型小鼠全肠道菌群移植到正常小鼠肠道后,发现正常小鼠回肠组织、肠道菌群多样性及组成的改变均显著高于结肠,表明在“心与小肠相表里”的指导下,回肠肠道微环境可能和AD的发生发展关系更加密切,拓展了“心与小肠相表里”中医理论的现代科学内涵。不足的是,本研究主要从肠道菌群的角度探讨了回肠和结肠肠道微环境与AD的关系,对于肠道微环境其他组成部分(如菌群代谢、宿主代谢等)与AD的关系未深入探讨。

参考文献

- [1] 鲍婷婷,杨凯麟,龙治勇,等.基于“心与小肠相表里”探讨肠道菌群与抑郁症[J].中国中西医结合杂志,2021,41(4):499-504.
Bao TT, Yang KL, Long ZY, et al. Discussion on depression and gut microbiota based on the theory of "Xin connecting with small intestine" [J]. Chin J of Integr Tradit West Med, 2021, 41(4): 499-504.
- [2] Yu TW, Lane HY, Lin CH. Novel therapeutic approaches for Alzheimer's disease: an updated review [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15):8208.
- [3] Kesika P, Suganthi N, Sivamaruthi BS, et al. Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease [J]. Life Sci, 2021, 264:118627.
- [4] 刘天浩,张晨阳,韩思思,等.基于肠道微环境探讨“从肠治肺”的新内涵[J].中华中医药杂志,2018,33(12):5350-5352.
Liu TH, Zhang CY, Han SS, et al. Discussion on new connotation of treating "lung from large intestine" based on intestinal microenvironment [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(12): 5350-5352.
- [5] Xu HM, Huang HL, Zhou YL, et al. Fecal microbiota transplantation: a new therapeutic attempt from the gut to the brain [J]. Gastroent Res Pract, 2021, 2021: 6699268.
- [6] Li N, Zuo B, Huang SM, et al. Spatial heterogeneity of bacterial colonization across different gut segments following inter-species microbiota transplantation [J]. Microbiome, 2020, 8(1):161.
- [7] Khoruts A, Sadowsky MJ. Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation [J]. Nat Rev Gastro Hepat, 2016, 13(9):508-516.
- [8] Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota [J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14(1):20-32.
- [9] Martinez-Guryn K, Leone V, Chang EB. Regional diversity of the gastrointestinal microbiome [J]. Cell Host Microbe, 2019, 26(3):314-324.
- [10] Seekatz AM, Schnizlein MK, Koenigsnecht MJ, et al. Spatial and temporal analysis of the stomach and small-intestinal microbiota in fasted healthy humans [J]. Msphere, 2019, 4(2):e00126-19.
- [11] Xu Q, Wen LM, Wei GH, et al. Marked response of rat ileal and colonic microbiota after the establishment of Alzheimer's disease model with bilateral intraventricular injection of A β (1-42) [J]. Front Microbiol, 2022, 13:819523.
- [12] 许青,赵晓芹,刘彦君,等.基于“心与小肠相表里”

- 探讨回肠菌群在七圣丸抗阿尔茨海默病中的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4):9-18.
- Xu Q, Zhao XQ, Liu YJ, et al. Changes in ileal flora induced by Qishengwan in treatment of Alzheimer's disease: an exploration based on "interior-exterior relationship between heart and small intestine" [J]. 2022, 28(4):9-18.
- [13] Wang M, Cao J, Gong C, et al. Exploring the microbiota-Alzheimer's disease linkage using short-term antibiotic treatment followed by fecal microbiota transplantation[J]. Brain Behav Immun, 2021, 96:227-238.
- [14] Rogers GB, Keating DJ, Young RL, et al. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways[J]. Mol Psychiatry, 2016, 21(6):738-748.
- [15] Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, et al. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems[J]. Ann Gastroenterol, 2015, 28(2):203-209.
- [16] Sampson TR, Mazmanian SK. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome [J]. Cell Host Microbe, 2015, 17(5):565-576.
- [17] 李洁, 鲁兴启, 杨莹, 等. 肠易激综合征伴抑郁患者静息态fMRI度中心度的研究[J]. 影像诊断与介入放射学, 2020, 29(2): 102-106.
- Li J, Lu XQ, Yang Y, et al. Degree centrality analysis on resting-state functional MRI in patients with irritable bowel syndrome and depressive symptoms [J]. Diagn Imaging & Interv Radiol, 2020, 29 (2) : 102-106.
- [18] Yarandi SS, Peterson DA, Treisman GJ, et al. Modulatory effects of gut microbiota on the central nervous system: how gut could play a role in neuropsychiatric health and diseases [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2016, 22(2):201-212.
- [19] Gareau MG. Microbiota-gut-brain axis and cognitive function[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 817:357-371.
- [20] Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi[J]. Mol Ecol, 2013, 22(21):5271-5277.
- [21] Tuomisto H. A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity [J]. Ecography, 2010, 33(1):2-22.
- [22] Zoetendal EG, Raes J, van den Bogert B, et al. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates [J]. ISME J, 2012, 6(7):1415-1426.
- [23] Xi JX, Ding D, Zhu HW, et al. Disturbed microbial ecology in Alzheimer's disease: evidence from the gut microbiota and fecal metabolome [J]. BMC Microbiol, 2021, 21(1):226.
- [24] Ji HF, Shen L. Probiotics as potential therapeutic options for Alzheimer's disease [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105(20):7721-7730.
- [25] Liu J, Yu C, Li R, et al. High-altitude Tibetan fermented milk ameliorated cognitive dysfunction by modified gut microbiota in Alzheimer's disease transgenic mice [J]. Food Funct, 2020, 11 (6) : 5308-5319.
- [26] Yu M, Mu C, Zhang C, et al. Marked response in microbial community and metabolism in the ileum and cecum of suckling piglets after early antibiotics exposure [J]. Front Microbiol, 2018, 9:1166.
- [27] 邓爱萍, 刘焦, 杨静, 等. 帕金森病与阿尔茨海默病患者肠道菌群及炎症因子分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2021, 30(1):60-65.
- Deng AP, Liu J, Yang Y, et al. Analysis of the level of inflammatory factors in serum and intestinal flora's changes in patients with Parkinson's disease and Alzheimer's disease [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2021, 30(1):60-65.
- [28] Marion S, Desharnais L, Studer N, et al. Biogeography of microbial bile acid transformations along the murine gut [J]. J Lipid Res, 2020, 61 (11) : 1450-1463.
- [29] Mahmoudiandehkordi S, Arnold M, Nho K, et al. Altered bile acid profile associates with cognitive impairment in Alzheimer's disease—an emerging role for gut microbiome [J]. Alzheimers Dement, 2019, 15(1):76-92.

(编辑 孙慧兰)