

·基础研究·

甘草素对去卵巢APP/PS1转基因小鼠肠道菌群的影响

耿清华^{1,2}, 赵月阳², 贺桂琼², 余华荣^{1,2}

(1. 重庆医科大学基础医学院生理学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016)

摘要:【目的】探讨甘草素(LG)对绝经前后APP/PS1小鼠肠道菌群的影响。【方法】将40只3月龄雌性APP/PS1双转基因小鼠随机分为假手术组(sham, n=20)、去卵巢组(OVX, n=20)。术后第7天,将每组小鼠再分别用LG和生理盐水处理,另取10只野生型C57BL/6J小鼠作正常对照组(WT)。LG处理组剂量为30 mg·kg⁻¹·d⁻¹,药物处理90 d后,采集粪便样本,提取基因组,采用16S rDNA扩增子测序对各组小鼠的肠道菌群进行分析;利用水迷宫,评估小鼠的学习与记忆能力;采用免疫荧光观察小鼠脑内老年斑(SP)。【结果】水迷宫结果表明, LG可显著改善绝经前后AD小鼠的学习记忆能力(P<0.05),显著减少绝经前后AD小鼠脑内老年斑数量,且差异均具有统计学意义(P<0.000 1)。16S rDNA测序结果显示, LG处理可显著增加绝经前后APP/PS1小鼠肠道中厚壁菌门和乳杆菌属的相对丰度(P<0.05),降低拟杆菌门下的有害菌的相对丰度(P<0.05)。LG处理后,别样棒菌属相对丰度在APP/PS1小鼠肠道中呈上升趋势(P>0.05),而在绝经APP/PS1小鼠肠道中下降(P>0.05),差异不具有统计学意义。LEfSe分析结果显示,在WT vs. Sham vs. LG比较中,正常WT小鼠肠道菌群中最具差异丰度的菌是厚壁菌门、芽孢杆菌纲和乳杆菌目(P<0.05);罗伊氏乳杆菌在LG组影响较大(P<0.05);拟杆菌纲、拟杆菌目拟杆菌属等在Sham组小鼠肠道聚集(P<0.05),差异均具有统计学意义。而在WT vs. Sham vs. OVX vs. OVX + LG比较中,厚壁菌门和别样棒菌属是WT组的优势菌群(P<0.05);在Sham组小鼠肠道中,拟杆菌门、拟杆菌纲和拟杆菌目影响较大(P<0.05);在OVX组小鼠,拟杆菌科和拟杆菌属最具差异丰度(P<0.05);而在OVX + LG组,乳杆菌科和乳杆菌属在OVX + LG组肠道中数量较高(P<0.05),差异均具有统计学意义。【结论】LG可改善绝经前后APP/PS1小鼠肠道中有益菌和有害菌的比例,减少其脑内老年斑数量,进而改善其学习记忆能力;LG对APP/PS1小鼠绝经前后部分肠道菌群的变化一致,但亦有差异。推测雌激素缺乏的APP/PS1小鼠存在脂质代谢紊乱,但该现象还有待进一步研究。

关键词: 阿尔茨海默病;甘草素;肠道菌群;绝经;乳杆菌属

中图分类号: R378

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2023)05-0768-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0507

Effect of Liquiritigenin on Intestinal Flora in Ovariectomized APP/PS1 Transgenic Mice

GENG Qing-hua^{1,2}, ZHAO Yue-yang², HE Gui-qiong², YU Hua-rong^{1,2}

(1. Department of Physiology of School of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China; 2.

Center for Neuroscience Research, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

Correspondence to: YU Hua-rong; E-mail: yuhuarong@cqmu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate the effect of liquiritigenin (LG) on intestinal flora in menopausal APP/PS1 mice.【Methods】A total of forty 3-month-old female APP/PS1 mice were randomly divided into sham surgery group (n=20) and ovariectomy group (n=20). Seven days after surgery, the ovariectomy group was randomly divided into ovariectomy control group (OVX, n=10), ovariectomy + liquiritigenin treatment group (OVX + LG, n=10), and the sham surgery group was randomly divided into liquiritigenin treatment group (LG, n=10) and reagent control group (Sham, n=10), and ten C57BL/6J mice were taken as WT group. The dose of LG group and OVX + LG group was 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹. After 90 days of drug treatment, fecal samples were gathered, genomes were extracted, and intestinal flora were analyzed by 16S rDNA

收稿日期: 2023-03-19

基金项目: 国家自然科学基金(81671257)

作者简介: 耿清华, 第一作者, 研究方向: 生理学, E-mail: tsinghua@stu.cqmu.edu.cn; 余华荣, 通信作者, 教授, E-mail: yuhuarong@cqmu.edu.cn

Amplicon Sequencing. Morris water maze was performed to evaluate learning and memory abilities of mice. Immunofluorescence was used to observe the deposition of senile plaques (SP) in the brain of mice.【Results】The results of water maze showed that LG significantly improved the learning memory ability of APP/PS1 mice with/without OVX ($P<0.05$), and reduced the number of SPs in the brain of APP/PS1 mice with/without OVX, and the differences were statistically significant ($P<0.0001$). 16s rDNA sequencing analysis of the relative abundance of gut microbiota proved that LG treatment significantly increased the relative abundance of *Firmicutes* and *Lactobacillus* ($P<0.05$) and reduced the relative abundance of harmful bacteria belong to *Bacteroidetes* ($P<0.05$) in APP/PS1 mice intestines with/without menopause. After LG treatment, the relative abundance of *Allobaculum* elevated in the intestines of APP/PS1 mice, while declined in the intestines of menopausal APP/PS1 mice, but the difference was not statistically significant. LEfSe analysis revealed the bacteria with the most differential abundance of the gut microbiota of WT mice were *Firmicutes*, *Bacillus*, and *Lactobacillales* ($P<0.05$); *Lactobacillus reuteri* had a greater influence on the LG group ($P<0.05$); *Bacteroidia*, *Bacteroidales* and *Bacteroides* gathered in the intestines of mice in the Sham group ($P<0.05$). *Firmicutes* and *Allobaculum* were the dominant in the WT group ($P<0.05$); *Bacteroides*, *Bacteroidia* and *Bacteroidales* were more abundant in the Sham group ($P<0.05$); *Bacteroidaceae* and *Bacteroides* had the most differential abundances in the OVX group ($P<0.05$); *Lactobacillaceae* and *Lactobacillus* were more abundant in the intestines in the OVX + LG group ($P<0.05$).【Conclusion】LG could improve the ratio of beneficial and harmful bacteria in the intestines of APP/PS1 mice before and after menopause. Liquiritigenin treatment showed consistent variations in intestinal flora in APP/PS1 mice with or without ovariectomy. It is presumed that menopausal APP/PS1 mice have lipid metabolism disorders which requires further study.

Key words: Alzheimer's disease; liquiritigenin; gut microbiota; menopause; *Lactobacillus*

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2023, 44(5): 768-775]

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种慢性进行性神经退行性疾病。临床表现为进行性记忆和认知功能衰退,并伴有各种执行功能和运动障碍^[1],严重影响患者生活质量和社会医疗负担。截至2019年,仅中国就有超过1 000万的AD患者,约占全球患者的1/3^[2]。随着世界人口老龄化的加剧,该数目还在持续增加,预计到2050年,我国的AD患者将超过3 000万^[3],将给我国造成巨大的社会和经济负担。一项流行病学研究显示,AD患者中女性占了三分之二;同时,绝经后女性的发病率比同龄男性约高3倍^[4]。雌激素在大脑中具有神经保护作用,而女性绝经后,卵巢功能衰退和雌激素的缺乏可能导致大脑代谢的异常,进而导致AD。甘草素(liquiritigenin, LG)具有抗氧化^[5],抗病毒^[6],抗菌^[6],抗肿瘤^[7]等活性。已有研究表明LG具有雌激素类似的调节作用,故被列为植物雌激素中的一种。有研究指出, LG可能通过上调脑内ER β 蛋白水平、减少老年斑的沉积从而对AD发挥神经保护作用^[8]。肠道菌群是组成人体菌群的重要部分,菌群在体内平衡失调可能会影响大脑^[9]。有研究表明,失衡的肠道菌群与神经发育、神经心理学和神经退行性疾病有关^[10],肠道微生物群已成为阿尔茨海默病的潜在诊断和治疗靶点。但LG是

否能够通过调节绝经前后APP/PS1小鼠的肠道菌群组成进而改善小鼠的学习记忆能力,笔者未见文献报道。因此,本课题旨在从肠道菌群角度探讨LG对APP/PS1小鼠和去卵巢(ovariectomy, OVX)APP/PS1保护作用的机制,为临床上AD的防治提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 动物

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级3月龄雌性APP/PS1 (APP^{swe}, PSEN1dE9)双转基因小鼠,体质量20~22 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物许可证编号为SCXK(京)2019-0008。同品系同月龄SPF级C57BL/6J雌性小鼠购自重庆医科大学动物中心,许可证编号为SCXK(渝)2022-0010。所有小鼠饲养于温度(20~25) $^{\circ}$ C,相对湿度(55 \pm 5)%,光照时间12 h的重庆医科大学动物中心IVC级动物房,饮食饮水自由。所有动物实验均经重庆医科大学动物实验伦理委员会批准。

1.2 动物模型制备

3月龄SPF级APP/PS1雌性转基因小鼠按简单随机分组法分为假手术组(Sham组, $n=10$)、卵巢切

除组(OVX组, $n=10$)、甘草素处理组(LG组, $n=10$)和卵巢切除+甘草素处理组(OVX + LG组, $n=10$)。将OVX和OVX + LG组小鼠麻醉后置于俯卧位,于小鼠大腿根部上0.5 cm靠近脊柱做0.5 cm切口,逐层切开皮肤肌肉筋膜,靠近肾脏找到输卵管末端及卵巢,结扎输卵管末端,并切除卵巢,逐层缝合组织皮肤。相同方法摘除另一侧卵巢,由此建立雌激素缺乏模型。Sham组小鼠麻醉后找到卵巢,切除卵巢周围脂肪组织后缝合组织皮肤。所有小鼠按术前条件于IVC级动物房饲养1周。一周后OVX + LG组和LG组每天给予 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甘草素灌胃(用生理盐水作为溶剂),其他组小鼠每天均给予等体积生理盐水灌胃。五组小鼠均处理3个月。

1.3 药品与试剂

甘草素(成都曼思特生物科技有限公司);GeneJET凝胶回收试剂盒(Thermo Scientific公司);羧甲基纤维素钠(生工);Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer(New England Biolabs公司);Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒(Thermo Scientific公司),抗A β 抗体4g8(abcam)。

1.4 水迷宫实验

Morris水迷宫实验测试各组小鼠空间学习记忆能力的变化:将小鼠放在直径为120 cm,高为80 cm的水池内,池中放一平台。实验方法:①第1天为可视平台训练:平台露出水面1 cm,以便小鼠发现平台。整个过程固定平台位置,让小鼠从四个象限面向池壁入水。待所有小鼠能够在60 s内找到平台,即可进行正式实验。始终未能找到平台小鼠将不继续进行后续实验;②第2~6天为隐蔽平台实验:小鼠入水后,通过影像跟踪系统记录小鼠的运动轨迹,包括在60 s内找到平台的时间,即平台逃避潜伏期(escape latency to platform)。③空间探索实验:第7天,撤走平台,使小鼠在水池内搜索平台60 s,观察小鼠跨过平台相应位置的次数(cross number to platform),作为评价小鼠空间学习记忆能力的指标。

1.5 免疫荧光染色

将切片用0.01 mol/L PBS洗3次,每次10 min,10 g/L牛血清常温下封闭,弃牛血清后将一抗按照比例稀释至0.5% Triton中(Triton用0.01 mol/L PBS配置)配制成一抗,阴性对照用0.01 mol/L PBS代替一抗,每张玻片上加入150~200 μL 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第二天取出后复温30 min,0.01 mol/L PBS清洗3次,每次10 min。将二抗稀释至0.5%Triton中,加

入二抗后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱2 h,完成后弃二抗。10 min后用0.01 mol/L PBS清洗3次。防荧光淬灭封片剂进行封片。镜下观察拍照。

1.6 小鼠粪便收集

末次给药24 h后,收集小鼠粪便3~4颗于灭菌冻存管内,后置于液氮中保存,全部收集完成后迅速转移至-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存。

1.7 16S rDNA 测序分析

采用CTAB方法提取样本的基因组DNA,利用琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度,使用16S V4区引物515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-TAA-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTA-AT-3')对细菌16S rDNA V4区进行扩增,对扩增子进行纯化定量。使用ThermoFisher的Ion S5™XL进行上机测序。以97%的一致性(Identity)将序列聚类成为OTUs(Operational Taxonomic Units),用Mothur方法与SILVA132的SSUrRNA数据库进行物种注释分析,使用Qiime软件(Version 1.9.1)计算Shannon指数。使用LEfSe软件做LEfSe分析,设置LDA Score的筛选值为4。该部分由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.8 统计学方法

计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用IBM SPSS Statistics 26进行重复测量方差分析;使用LEfSe寻找标记性物种;使用GraphPad Prism 9进行单因素方差分析分析(One-way ANOVA),采用Tukey法进一步作两两比较,使用GraphPad Prism 9制作统计图。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

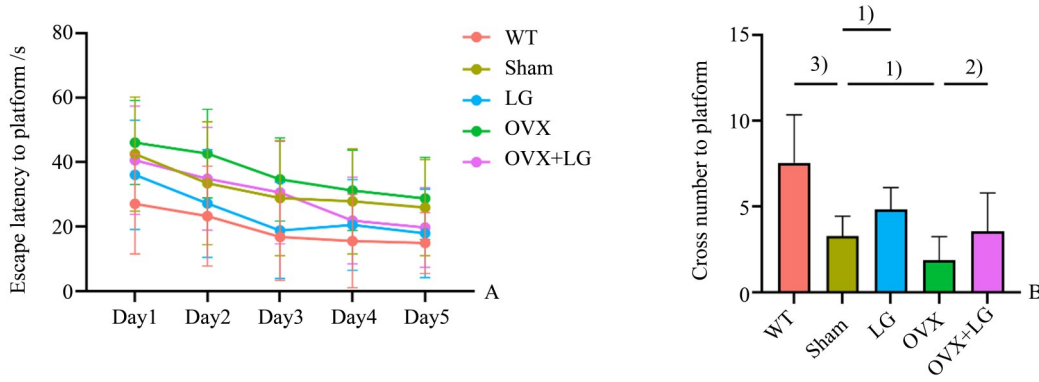
2 结果

2.1 小鼠学习记忆能力的变化

为了评估小鼠的空间学习和记忆能力,首先在Morris水迷宫中对小鼠进行了测试。结果表明(图1A),Sham组和OVX组小鼠的学习记忆能力减弱,而LG可改善绝经前后AD小鼠的学习记忆能力。重复测量方差分析发现,分组因素(Group)具有统计学意义($F=9.743, P < 0.05$),说明分组因素起作用,各组小鼠的逃避潜伏期指标总体不同;时间因素(Day)具有统计学意义($F=79.820, P < 0.05$),说明逃避潜伏期随时间而变化;但时间和分组(Day \times Group)的交互作用中没有统计学意义($F=1.589, P > 0.05$),说明时间因素的作用不随着分组的不同而

不同。在最后一天的探测试验中,移除平台,记录小鼠的平台区域穿越次数。结果显示(图1B),经单因素方差分析,5组间总的比较,差异有统计学意义($F=33.77, P<0.0001$)。采用Tukey法进一步作两两比较,结果表明,与WT组小鼠相比,Sham组

小鼠平台区域穿越次数显著减少($P<0.05$);与Sham组小鼠相比, LG组小鼠平台区域穿越次数显著提高($P<0.05$),OVX组小鼠平台区域穿越次数显著减少($P<0.05$);与OVX组小鼠相比,OVX+LG组小鼠平台区域穿越次数显著提高($P<0.05$)。



A: Escape Latency to Platform (s). B: Cross number to Platform. $n = 10$. 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$, 3) $P<0.0001$.

图1 评估小鼠学习记忆能力

Fig. 1 Evaluation of learning and memory abilities and anxiety in mice

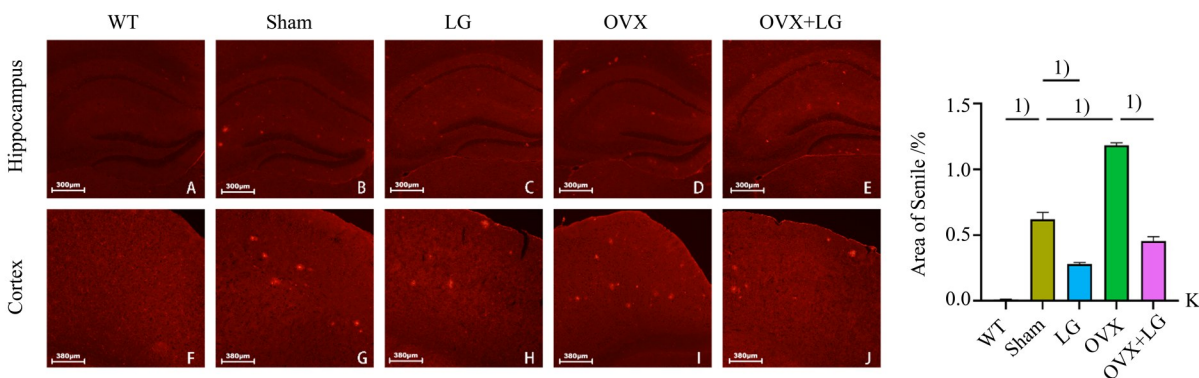
2.2 小鼠脑内老年斑数量变化分析

经单因素方差分析,免疫荧光结果(图2K)5组间总的比较,差异有统计学意义($F=652.5, P<0.0001$)。采用Tukey法进一步作两两比较,结果表明,与WT组小鼠相比,Sham组小鼠脑内老年斑显著增多($P<0.0001$);与Sham组小鼠相比,OVX组小鼠脑内老年斑显著增多($P<0.0001$)。LG处理可显著

减少绝经前后AD小鼠脑内老年斑数量,且差异均具有统计学意义($P<0.0001, P<0.0001$)。

2.3 小鼠肠道菌群的变化

2.3.1 物种累积箱形图 物种累积箱形图趋于平缓(图3),提示16S rDNA扩增子测序中检测到的物种数量并不会随着样本量的增多而增多,故本实验采集的样本量充分。



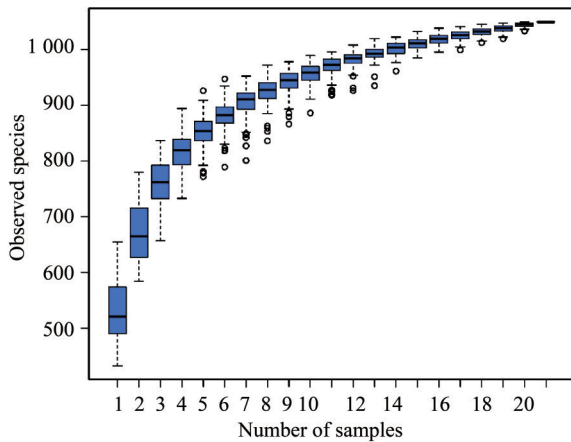
Images of Aβ by the method of immunofluorescence staining in hippocampus (A-E) and cortex (F-J) regions. Scale bar=300 μm in A-E, Scale bar =380 μm in F-J. $n = 3$. K: Quantifications of senile plaques in the brain of five groups. 1) $P<0.0001$.

图2 小鼠脑内老年斑检测

Fig. 2 Detection of Aβ in the brain by immunofluorescent staining

2.3.2 各组小鼠肠道菌群香浓指数分析 香浓指数是计算群落分布丰富度的指数(图4)。经单因素方差分析,5组间总的比较,差异有统计学意义

($F=9.899, P=0.0003$)。采用Tukey法进一步作两两比较,结果表明,与WT组相比,Sham组的香浓指数显著升高($P<0.05$);与Sham组相比,OVX组的香



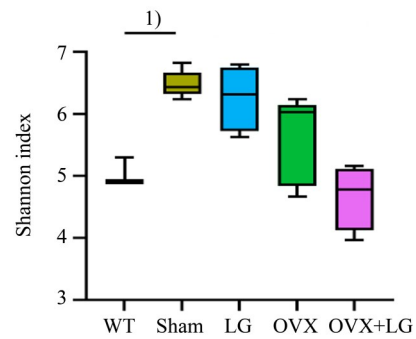
Species accumulation boxplot indicating that the number of species detected in 16S rDNA amplicon sequencing does not increase with the increase of sample size, so the sample size collected in this experiment is sufficient.

图3 物种累积箱形图

Fig. 3 Species accumulation boxplot

浓指数呈下降趋势($P>0.05$); Sham组与LG组香浓指数的差异不具有统计学意义;与OVX组相比,OVX+LG组表现出降低的趋势($P>0.05$)。

2.3.3 小鼠肠道菌群相对丰度水平及差异分析在门水平上(图5A),小鼠的肠道菌群主要由厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)等组成,其中厚壁菌门和拟杆菌门是优势菌群。对各组小鼠肠道菌群物种相对丰度进行单因素方差分析发现,五组间总的比较,厚壁菌门($F=32.2, P<0.0001$)和拟杆菌门($F=34.02, P<0.0001$)差异有统计学意义,采用Tukey法进一步作两两比较,结果表明,与WT组小鼠相比,Sham组小鼠的厚壁菌门相对丰度显著下降($P<0.05$),而拟杆菌门相对丰度均显著升高($P<0.05$),说明Sham组小鼠的肠道菌群平衡被破坏;与Sham组小鼠相比,OVX组的厚壁菌门相对丰度有升高的趋势($P>0.05$),拟杆菌门相对丰度显著下降($P<0.05$),提示雌激素缺乏能够影响肠道菌群;与Sham组小鼠相比,LG组厚壁菌门相对丰度显著升高($P<0.05$),拟杆菌门相对丰度显著下降($P<0.05$);与OVX组小鼠相比,OVX+LG组同样回调了厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度,即厚壁菌门相对丰度显著升高($P<0.05$),拟杆菌门相对丰度显著下降($P<0.05$)。即在门水平,LG对APP/PS1小鼠在绝经前后的肠道菌群发挥的作用相似,均降低了拟杆菌门的相对丰度,提高了厚壁菌门相对丰度。在属水平上(图



Comparison among multiple samples was performed using one-way ANOVA. $n = 10$, 1) $P<0.01$.

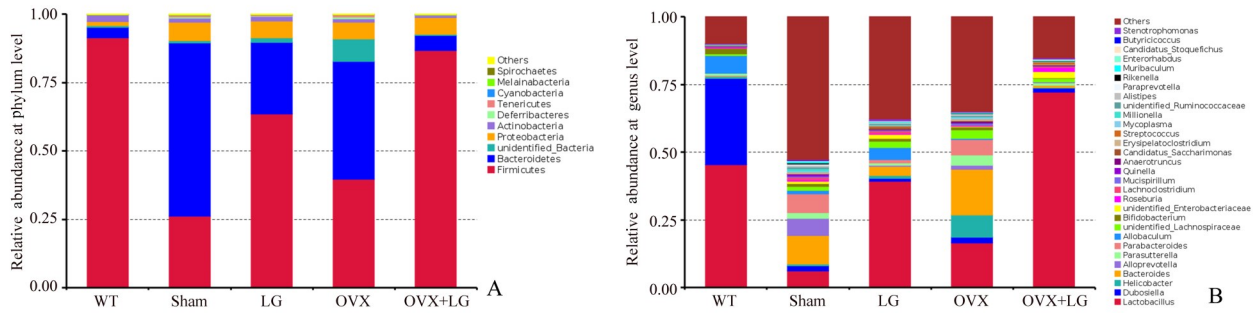
图4 各组小鼠肠道菌群的香浓指数

Fig. 4 Shannon index of intestinal flora in each group of mice

5B),经单因素方差分析,五组间总的比较,菌群相对丰度差异有统计学意义,其中乳杆菌属(*Lactobacillus*, $F=15.55, P<0.0001$)、杜氏杆菌属(*Dubosiel-la*, $F=33.23, P<0.0001$)、别样棒菌属(*Allobaculum*, $F=7.546, P=0.0013$)、链球菌属(*Streptococcus*, $F=9.783, P=0.0003$)、拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*, $F=6.268, P=0.0031$)、副拟杆菌属(*Parabacteroides*, $F=15.96, P<0.0001$)、*Millionella* ($F=5.934, P=0.004$)、另枝菌属(*Alistipes*, $F=3.784, P=0.0238$)、穆里巴库鲁姆菌属(*Muribaculum*, $F=3.991, P=0.0197$)、拟杆菌属(*Bacteroides*, $F=8.042, P=0.0009$)、理研菌属(*Rikenella*, $F=3.540, P=0.0298$);采用Tukey法进一步作两两比较,结果表明,与WT组小鼠相比,Sham组小鼠的乳杆菌属(*Lactobacillus*)、杜氏杆菌属(*Dubosiella*)和别样棒菌属(*Allobaculum*)相对丰度显著降低($P<0.05$),链球菌属(*Streptococcus*)有下调的趋势($P>0.05$),而拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)、副拟杆菌属(*Parabacteroides*)、*Millionella*、另枝菌属(*Alistipes*)、穆里巴库鲁姆菌属(*Muribaculum*)显著升高($P<0.05$),拟杆菌属(*Bacteroides*)和理研菌属(*Rikenella*)有升高的趋势($P>0.05$);相比Sham组,OVX组小鼠的*Millionella*和拟普雷沃氏菌属显著下降($P<0.05$)。与Sham组小鼠相比,LG组小鼠的乳杆菌属(属于厚壁菌门)相对丰度显著升高($P<0.05$),别样棒菌属相对丰度有升高的趋势($P>0.05$),而拟普雷沃氏菌属和副拟杆菌属相对丰度显著低于Sham组($P<0.05$),穆里巴库鲁姆菌属、*Millionella*、拟杆菌属、另枝菌属和理研菌属有下降的趋势($P>0.05$)。相比OVX组,OVX+LG组小鼠的乳杆菌属和链球菌属显著升高($P<0.05$),而拟杆菌

属、副拟杆菌属显著下降($P < 0.05$), *Parasutterella*、另枝菌属和理研菌属相对丰度有下降的趋势($P >$

0.05)。另外,别样棒菌属虽然也属于厚壁菌门,但其相对丰度在OVX+LG组呈现下降的趋势($P > 0.05$)。



Analysis of relative abundance of each group. A: Relative abundance at phylum level; B: Relative abundance at genus level. Different colors represent different flora. $n = 10$.

图5 物种相对丰度柱形图

Fig 5 Relative abundance of intestinal flora

2.3.4 各组小鼠肠道菌群差异物种分析 采用线性判别分析算法(Linear discriminant analysis Effect Size, LEfSe)方法分析各物种丰度对组间差异效果影响大小(附图1)。当不涉及绝经时,即在WT vs. Sham vs. LG比较中(附图1A~B),正常WT小鼠肠道菌群中最具差异丰度的菌是厚壁菌门、芽孢杆菌纲(*Bacilli*)和乳杆菌目(*Lactobacillales*)。罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)在LG组影响较大。拟杆菌纲(*Bacteroidia*)、拟杆菌目(*Bacteroidales*)和拟杆菌属等在Sham组小鼠肠道聚集。而在WT vs. Sham vs. OVX vs. OVX+LG比较中(附图1C~D),厚壁菌门和别样棒菌属是WT组的优势菌群;在Sham组小鼠是拟杆菌门、拟杆菌纲(*Bacteroidia*)和拟杆菌目(*Bacteroidales*)影响较大;在OVX组小鼠是拟杆菌科(*Bacteroidaceae*)和拟杆菌属最具差异丰度;而在OVX+LG组,乳杆菌科(*Lactobacillaceae*)和乳杆菌属在OVX+LG组肠道中数量较高。



附图
Appendix figure

3 讨论

阿尔茨海默病是一种慢性进行性神经退行性疾病,被认为是中老年人中最常见的痴呆形式。其特征是记忆丧失、无法进行正常的日常生活活动和行为改变^[11]。肠道菌群指寄居在人类及动物肠道内的大量微生物群。本研究旨在研究LG对绝经前和绝经后APP/PS1小鼠肠道菌群影响。我们发现

雌激素缺乏以及LG处理可以显著改变肠道菌群的结构组成。此外,LG对肠道菌群的影响也显示出与AD相关。

在门水平上,各组小鼠的肠道菌群主要由厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门等组成,这与其他研究结果相似^[12]。有研究比较了25名AD患者和25名健康对照者的肠道菌群,结果显示AD患者的厚壁菌门相对丰度的减少和拟杆菌门相对丰度的增加^[13]。这与本研究结果类似。而LG可显著提高厚壁菌门,减少拟杆菌门相对丰度,提示LG有改善肠道菌群的作用。*Muribaculaceae*是从C57BL/6J小鼠粪便中新分离的细菌,属于拟杆菌门,有研究表明,*Muribaculaceae*相对丰度在便秘模型小鼠肠道中显著升高^[14]。穆里巴库鲁姆菌属属于*Muribaculaceae*科,有临床研究表明,厚壁菌门在2型糖尿病患者肠道菌群中相对丰度较低而穆里巴库鲁姆菌属相对丰度较高^[15-16],而糖尿病是AD的危险因素之一^[17],这提示厚壁菌门的降低和穆里巴库鲁姆菌属的升高可能是糖尿病患者患AD风险增加的因素。

LEfSe分析结果提示,拟杆菌门下的菌群可能对AD的发展有密切关系。拟杆菌门包括肠道中多种多样且丰富的革兰氏阴性共生细菌,革兰氏阴性菌的主要外膜成分是脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)^[18],有报道称,AD患者的海马和颞叶上皮层的脑裂解液中存在细菌脂多糖,一些来自晚期AD海马病例的样本显示,与年龄匹配的对照组相比,LPS增加了26倍^[19]。小胶质细胞TLR2s可被LPS

激活,随后诱导细胞因子的产生、炎症、吞噬和先天免疫防御反应,直接影响中枢神经系统稳态^[20]。拟杆菌属属于拟杆菌门,是肠道内最常见的一种条件致病菌,可以经由感染、内毒素及5-羟色胺等多种途径致病^[21]。理研菌属,属于拟杆菌门,是分泌硫酸酶的细菌,引起细菌内毒素血症水平升高和慢性低度炎症^[22];另枝菌属,属于拟杆菌门,具有最多的腐败途径,腐败是肠道微生物在胃肠道中发酵未消化的蛋白质,通常导致细菌产生有害的代谢物^[23]。另枝菌属相对丰度的增加会破坏肠脑轴,另枝菌属是一种吲哚阳性生物,另枝菌属相对丰度的增加会降低血清素的可用性,而血清素的减少与抑郁有关^[24]。因此,拟杆菌门相对丰度的增加可能会导致LPS从肠道易位进入体循环的增加,随后通过炎症或其他途径促进AD病理进程。LG处理后,拟杆菌门在绝经前和绝经后AD小鼠肠道中的相对丰度显著下调,拟杆菌属、理研菌属和另枝菌属等也显著下降或表现出下调趋势,这显示LG能降低肠道中有害菌的比例。通过LEfSe分析可知,OVX + LG组小鼠肠道内菌群增加主要表现在厚壁菌门下的乳杆菌属的富集;LG组小鼠肠道中罗伊氏乳杆菌是优势菌群。罗伊氏乳杆菌是经过充分研究的一种益生菌,能在大量哺乳动物中定殖,产生罗伊氏菌素抑制致病菌生长^[25]。有研究表明,AD患者肠道菌群紊乱主要由乳杆菌属下降导致,并且与炎症因子相互作用,与患者病情发生有关^[26],且从乳杆菌属中提取的乙酰胆碱可以作用于中枢和末梢神经系统的神经递质,以及认知功能,尤其是与学习和记忆密切相关的功能^[27]。在本研究中,LG可显著提高绝经前后APP/PS1小鼠肠道中与AD和认知相关的乳杆菌属的相对丰度,提示LG具有增加肠

道中有益菌乳杆菌属相对丰度的功效,从而发挥改善肠道菌群的作用。别样棒菌属是产丁酸盐菌,丁酸盐是一种短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA),是肠上皮细胞的重要能源,对维持肠道屏障的正常功能具有重要作用^[28]。有研究表明,别样棒菌属相对丰度在高脂饮食小鼠肠道中数量较高且与血管生成素样蛋白4(Angiopoietin-like Protein 4, ANGPTL4)的表达水平正相关,与炎症、胰岛素抵抗和肥胖呈负相关^[29]。ANGPTL4是一种分泌糖蛋白,在脂质代谢中可以抑制脂蛋白脂肪酶的活性,从而促进循环甘油三酯水平的增加^[30]。雌激素缺乏会促进代谢功能障碍,从而导致活力低下、肥胖、代谢综合征和2型糖尿病^[31-32]。在本研究中,别样棒菌属相对丰度在AD小鼠肠道中下降,在雌激素缺乏的AD小鼠肠道中相对丰度也较低,而在LG处理后,在LG组小鼠肠道中上升,而在绝经AD小鼠仍呈现下降趋势,提示在绝经AD小鼠中,可能存在脂质代谢障碍。

由此可见,肠道菌群可能是LG发挥改善认知作用的重要靶点之一,为临床上绝经女性AD的防治提供了实验依据。LG可以同时显著增加绝经前和绝经后APP/PS1小鼠肠道中属于厚壁菌门的乳杆菌属等有益菌的相对丰度,降低属于拟杆菌门的拟杆菌属、另枝菌属、理研菌属等有害菌的相对丰度,对肠道菌群起到一定的改善作用,进而减少脑内老年斑,改善小鼠的学习记忆能力;LG处理在绝经前后APP/PS1小鼠肠道菌群引起的变化信号部分一致,但亦有差异:LG处理后,别样棒菌属相对丰度在APP/PS1小鼠肠道中上升,而在雌激素缺乏APP/PS1小鼠肠道中下降,推测绝经APP/PS1小鼠存在脂质代谢紊乱,但该现象还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Graff-Radford J, Yong KXX, Apostolova LG, et al. New insights into atypical Alzheimer's disease in the era of biomarkers [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(3): 222-234.
- [2] 任汝静, 殷鹏, 王志会, 等. 中国阿尔茨海默病报告 2021 [J]. *诊断学理论与实践*, 2021, 20(4): 317-337.
Ren RJ, Yin P, Wang ZH, et al. China Alzheimer's Disease Report 2021 [J]. *J Diagn Conce & Pract*, 2021, 20(4): 317-337.
- [3] 王英全, 梁景宏, 贾瑞霞, 等. 2020-2050年中国阿尔茨海默病患病情况预测研究 [J]. *阿尔茨海默病及相关病*, 2019, 2(1): 289-298.
Wang YQ, Liang JH, Jia RX, et al. Alzheimer disease in China (2015-2050) estimated using the 1% population sampling survey in 2015 [J]. *Chin J Alz Dis Relat Disor*, 2019, 2(1): 289-298.
- [4] Carter CL, Resnick EM, Mallampalli M, et al. Sex and gender differences in Alzheimer's disease: recommendations for future research [J]. *J Womens Health (Larchmt)*, 2012, 21(10): 1018-23.
- [5] Xie XW. Liquiritigenin attenuates cardiac injury induced by high fructose-feeding through fibrosis and inflammation suppression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 86: 694-704.

- [6] Wang L, Yang R, Yuan B, et al. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(4): 310–5.
- [7] Meng FC, Lin JK. Liquiritigenin inhibits colorectal cancer proliferation, invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition by decreasing expression of runt-related transcription factor 2 [J]. *Oncol Res*, 2019, 27(2): 139–146.
- [8] 姚秋会, 贺桂琼, 骆世芳, 等. 甘草素对去卵巢APP/PS1双转基因小鼠的保护作用初探[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(3): 1110–1116.
Yao QH, He GQ, Luo SF, et al. Research on the protective effect of liquiritigenin on ovariectomized APP/PS1 double-transgenic mice [J]. *Genom Appl Biol*, 2018, 37(3): 1110–1116.
- [9] Seki D, Mayer M, Hausmann B, et al. Aberrant gut-microbiota-immune-brain axis development in premature neonates with brain damage [J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(10): 1558–1572 e6.
- [10] Morais LH, Schreiber HLT, Mazmanian SK. The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(4): 241–255.
- [11] Alzheimer's Association. 2023 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2023 Apr;19(4):1598–1695.
- [12] 张丹丹, 叶晓川. 基于肠道菌群和代谢组学探讨茯苓酸性多糖宁心的作用机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(5): 2575–2583.
Zhang DD, Ye XC. Mechanism of *Poria cocos* acidic polysaccharide in quieting the spirit based on intestinal flora and metabolomics [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(5): 2575–2583.
- [13] Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland K A, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13537.
- [14] 周凯旋, 鲍慧玮, 朱志杰, 等. 复方嗜酸乳杆菌片对便秘的治疗作用及对肠道菌群的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(20): 2031–2038.
Zhou KX, Bao HW, Zhu ZJ, et al. Therapeutic effect of compound *Lactobacillus acidophilus* tablets on constipation and its impact on intestinal flora in mice [J]. *J Army Med Univ*, 2020, 42(20): 2031–2038.
- [15] 宋丹丹, 米焱, 王彩丽. 基于高通量测序对糖尿病肾脏疾病和2型糖尿病肠道菌群失调模式的研究 [J]. *临床肾脏病杂志*, 2021, 21(11): 887–894.
Song DD, Mi Y, Wang CL. Patterns of intestinal flora imbalance in diabetic kidney disease and type 2 diabetes based upon high-throughput sequencing [J]. *J Clin Nephro*, 2021, 21(11): 887–894.
- [16] Larsen N, Vogensen FK, Van Den Berg FW, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9085.
- [17] 尹昊文, 刘冠含, 李笑阳, 等. 我国阿尔茨海默病发病风险因素的系统评价 [J]. *吉林医学*, 2019, 40(6): 1231–1234.
Yin HW, Liu GH, Li XY, et al. Systematic evaluation of risk factors for the development of Alzheimer's disease in China [J]. *Jilin Med J*, 2019, 40(6): 1231–1234.
- [18] Whitfield C, Trent MS. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides [J]. *Annu Rev Biochem*, 2014, 83: 99–128.
- [19] Zhao Y, Jaber V, Lukiw WJ. Secretory products of the human GI tract microbiome and their potential impact on Alzheimer's disease (AD): detection of lipopolysaccharide (LPS) in AD Hippocampus [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 318.
- [20] Zhao Y, Dua P, Lukiw WJ. Microbial sources of amyloid and relevance to amyloidogenesis and Alzheimer's disease (AD) [J]. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*, 2015, 5(1): 177.
- [21] Bechon N, Ghigo JM. Gut biofilms: Bacteroides as model symbionts to study biofilm formation by intestinal anaerobes [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2022, 46(2): fuab054.
- [22] Li XW, Chen HP, He YY, et al. Effects of rich-polyphenols extract of *dendrobium ioddigesii* on anti-diabetic, anti-inflammatory, anti-oxidant, and gut microbiota modulation in db/db mice [J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3245.
- [23] Windey K, De Preter V, Verbeke K. Relevance of protein fermentation to gut health [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(1): 184–96.
- [24] Jiang H, Ling Z, Zhang Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 48: 186–194.
- [25] 张明新, 马雨哲, 赵馨, 等. 基于16S rRNA测序分析罗伊氏乳杆菌酸乳对健康小鼠肠道菌群的影响 [J]. *食品科技*, 2023, 48(1): 8–15.
Zhang MX, Ma YZ, Zhao X, et al. Effect of *Lactobacillus Reuteri* Yogurt on Intestinal Flora in Healthy Mice Based on 16S rRNA [J]. *Food Sci and Technol*, 2023, 48(1): 8–15.
- [26] 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]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2021, 30(1): 60–65.
Deng AP, Liu J, Yang J, 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 Hepato* 2021, 30(1): 60–65.
- [27] Kawashima K, Misawa H, Moriaki Y, et al. Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems [J]. *Life Sci*, 2007, 80(24–25): 2206–2209.
- [28] Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites [J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1332–1345.
- [29] Zheng Z, Lyu W, Ren Y, et al. Allobaculum involves in the modulation of intestinal ANGPTL4 expression in mice treated by high-fat diet [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 690138.
- [30] Fernandez-Hernando C, Suarez Y. ANGPTL4: a multifunctional protein involved in metabolism and vascular homeostasis [J]. *Curr Opin Hematol*, 2020, 27(3): 206–213.
- [31] Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis [J]. *Endocr Rev*, 2013, 34(3): 309–338.
- [32] Carr M C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(6): 2404–2411.