

基于16S rDNA测序研究当归芍药散调控肠道菌群改善SAMP8小鼠认知能力的作用机制

田小平¹, 夏军¹, 卫静雯², 彭伟¹, 淮文英¹, 游宇¹, 张天娥¹, 张佳缘¹, 黄巍^{1*}, 陈云慧^{1*}
(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 四川大学, 成都 610041)

[摘要] 目的: 基于16S rDNA测序研究当归芍药散(DSS)对阿尔茨海默病(AD)模型小鼠SAMP8肠道菌群的影响。方法: 按随机数字表法, 将24只7月龄SAMP8小鼠分为DSS低、中、高剂量组(14.4、28.8、57.6 g·kg⁻¹·d⁻¹)及模型组, 另取6只同月龄SAMR1小鼠, 为正常组。连续给药8周后, 采用16S rDNA高通量测序技术检测小鼠粪便肠道菌群的变化; Morris水迷宫实验评价小鼠定位航行与空间探索能力; 尼氏染色观察海马CA1区神经元病理变化; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测海马β淀粉样蛋白(Aβ)和Tau蛋白过度磷酸化(p-Tau)蛋白含量。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠肠道菌群α多样性降低, β多样性明显改变; 逃避潜伏期延长($P < 0.05$), 穿越平台象限次数和平台象限停留时间明显减少($P < 0.05$); CA1区神经元尼氏小体数量明显减少($P < 0.05$); Aβ和p-Tau蛋白水平明显升高($P < 0.05$)。DSS干预后, 各组小鼠肠道菌群α多样性均增加, 中、高剂量组β多样性与正常组相似, 以中剂量组效果最佳; 在门水平上, 厚壁菌门丰度明显增加($P < 0.05$), 拟杆菌门、变形菌门丰度明显降低($P < 0.05$); 在属水平上, 乳酸杆菌等菌属丰度明显增加($P < 0.05$), 拟杆菌、幽门螺杆菌、理研菌、副杆状菌、萨特氏菌、黏液性菌等菌属丰度明显降低($P < 0.05$); 小鼠逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$), 穿越平台象限次数和平台象限停留时间明显增加($P < 0.05$); 尼氏小体数量明显增加($P < 0.05$), Aβ和p-Tau蛋白水平明显降低($P < 0.05$); Pearson相关性分析表明黏液性菌、拟杆菌和萨特氏菌菌属丰度与SAMP8小鼠认知能力呈负相关, 乳酸杆菌和Butyricimonas菌属丰度与SAMP8小鼠认知能力呈正相关。结论: DSS可改善SAMP8小鼠认知能力, 其作用机制可能与调节肠道菌群多样性、群落组成有关。

[关键词] 阿尔茨海默病(AD); 当归芍药散; SAMP8; 肠道菌群

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0026-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221909 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221026.1854.005.html>

[网络出版日期] 2022-10-27 11:06

Mechanisms of Danggui Shaoyaoan in Improving Cognitive Ability in SAMP8 Mice by Regulating Gut Microbiota via 16S rDNA Sequencing

TIAN Xiaoping¹, XIA Jun¹, WEI Jingwen², PENG Wei¹, HUAI Wenyong¹, YOU Yu¹, ZHANG Tiane¹, ZHANG Jiayuan¹, HUANG Wei^{1*}, CHEN Yunhui^{1*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the effects of Danggui Shaoyaoan (DSS) on the gut microbiota of the Alzheimer's disease (AD) model in SAMP8 mice based on 16S rDNA sequencing. **Method:** Twenty-four

[收稿日期] 2022-08-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603537, 82074329); 四川省科技厅国际合作与交流项目(2017HH0004); 四川省中医药管理局项目(2021MS464); 成都中医药大学青年学者人才项目(QNXZ2019043); 四川省名中医工作室建设项目(川中医药办202120)

[第一作者] 田小平, 博士, 副主任医师, 从事中医药防治消化系统疾病作用机制研究工作, Tel: 028-84445399, E-mail: tianxiaoping@cdutcm.edu.cn

[通信作者] * 黄巍, 博士, 教授, 从事方药配伍理论研究, Tel: 028-61800000, E-mail: gracehw@sohu.com;

* 陈云慧, 博士, 副教授, 从事经方配伍规律与作用机制、中医药数据挖掘及分析、中医经典国际传播研究工作, E-mail: chenyunhui@cdutcm.edu.cn

SAMP8 mice aged seven months were randomly divided into low-, medium-, and high-dose DSS groups (14.4, 28.8, 57.6 g·kg⁻¹·d⁻¹) and a model group according to a random number table, with six rats in each group. Six SAMR1 mice of the same age were assigned to the normal group. After intragastric administration for eight consecutive weeks, 16S rDNA sequencing was performed to detect the gut microbiota of feces in mice. Morris water maze was employed to assess the directional navigation and space exploration ability of mice. Nissl staining was performed to observe the pathological changes of neurons in the hippocampal CA1 area. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to measure the protein content of hippocampal amyloid β -protein (A β) and hyperphosphorylated Tau (p-Tau). **Result:** Compared with the normal group, the model group presented a declining α diversity ($P<0.05$), markedly altered β diversity, prolonged escape latency ($P<0.05$), reduced number of platform crossings and cumulative duration in the targeted quadrant ($P<0.05$), decreased neurons and Nissl bodies in the CA1 hippocampal area, and up-regulated A β and p-Tau expression ($P<0.05$). However, DSS intervention enhanced the α diversity, and medium- and high-dose DSS, especially the medium-dose DSS, could result in α diversity similar to the control group. Moreover, at the phylum level, the abundance of Firmicutes increased ($P<0.05$), while the abundance of Bacteroidetes and Proteobacteria decreased ($P<0.05$). At the genus level, the abundance of *Lactobacillus* and other genera increased ($P<0.05$), while the abundance of *Bacteroides*, *Helicobacterium*, *Rikenella*, *Parabacteroides*, *Sutterella*, and *Mucilaginibacter* decreased ($P<0.05$). The DSS groups also showed shortened escape latency ($P<0.05$), increased number of platform crossings and cumulative duration in the targeted quadrant ($P<0.05$), increased Nissl bodies ($P<0.05$), and reduced A β and p-Tau content ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that the abundance of *Mucilaginibacter*, *Bacteroides*, and *Sutterella* was negatively correlated with the cognitive ability of SAMP8 mice, while the abundance of *Lactobacillus* and *Butyricimonas* was positively correlated with the cognitive ability of SAMP8 mice. **Conclusion:** DSS can improve the cognitive ability of SAMP8 mice, and its mechanism may be related to the regulation of gut microbiota diversity and community composition.

[Keywords] Alzheimer's disease; Danggui Shaoyaosan; SAMP8; gut microbiota

阿尔茨海默病(AD)是一种进行性神经退行性疾病,临床表现包括学习判断能力降低、近期记忆障碍、情绪改变和行为失常等。其起病隐匿,多见于65岁以上的人群。随着全球老龄化现象日益加剧,其发病率逐年上升^[1]。AD主要特征性病理改变包括 β 淀粉样蛋白(A β)沉积形成的老年斑、磷酸化Tau蛋白(p-Tau)聚集而成的神经原纤维缠结和神经元丢失。其发病机制十分复杂,迄今尚未完全明确^[2]。近年来,越来越多的研究表明AD的发生发展与肠道菌群失调密切相关。人体胃肠道定植着约10¹⁴个、1 000多种微生物群落,细菌密度达10¹¹~10¹²个/mL,是已知细菌密度最高的微生物生态系统。生理状态下,肠道菌群种类、数量和比例相对稳定,且与宿主保持动态平衡,调节宿主大脑功能、影响宿主认知行为,被称为“第二大脑”。提示调控肠道菌群可能是AD有效防治策略之一^[3-4]。

AD属于祖国医学“好忘、喜忘、呆、愚痴”等病范畴。近年来,围绕中医药防治本病开展了大量研究,对于本病病因病机的认识也不断丰富^[5]。相关

因子分析结果提示,肝郁、脾虚、痰浊、瘀血是其发生发展的关键要素^[6]。经典名方当归芍药散(DSS)药用仅6味,功擅“肝脾同调、血水并治”,数项研究结果表明该方可明显改善AD患者认知功能及生活能力、疗效确切,是临床治疗AD有效方剂^[7-9]。基础研究证实DSS能减少脑内病理性异常蛋白沉积、改善氧化应激损伤、抑制炎症反应、调节脂质代谢等药理作用^[10],但其作用机制是否与调节肠道菌群有关?在前期研究中,本课题组通过体内、外实验证实DSS能改善SAMP8小鼠认知能力,减少A β 和p-Tau异常沉积,提高AD细胞模型细胞活率、降低细胞凋亡率^[11-12],现拟在此基础上,继续采用AD经典动物模型快速老化SAMP8小鼠,结合高通量测序Illumina Miseq平台的16S rRNA技术,探讨该方调控肠道菌群改善AD的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物 24只SPF级雄性SAMP8快速老化小鼠,鼠龄7月龄,体质量(28.56±1.80)g;6只SPF级雄性SAMR1正常老化小鼠,鼠龄7月龄,体质量

(33.02±2.80) g;均购自北京大学医学部实验动物科学部[实验动物合格证号SCXK(京)2016-0010]。小鼠单笼饲养,自由摄食饮水,适应性饲养7 d后开始实验;饲养环境为SPF级屏障系统,相对湿度40%~60%,温度(23±2)℃,光照12 h。成都中医药大学实验动物伦理委员会批准本实验(备案号2017-010-3)。

1.2 药物 DSS组成为当归(批号210105)、白芍(批号210207)、川芎(批号210301)、茯苓(批号210305)、白术(批号210119)、泽泻(批号210205),药材均购自成都中医大国医馆有限公司,经成都中医药大学药学院张廷模教授鉴定为正品,符合2020年版《中华人民共和国药典》相关项下要求。参考既往研究文献资料[12],制备生药含量质量浓度为2.0 g·mL⁻¹的DSS水煎剂,4℃保存备用。同时,为有效控制该制剂质量,采用薄层色谱法对水煎剂中当归(阿魏酸)和白芍(芍药苷)进行定性薄层鉴定。精密量取DSS水煎液1 mL于蒸发皿中,置于水浴锅上蒸干,加甲醇5 mL充分溶解,制得供试品溶液。另取阿魏酸对照品(购于成都瑞芬思德丹科技有限公司,批号A00211812016),加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。按照薄层色谱法(2020年版《中华人民共和国药典》四部通则0502),吸取上述两种溶液各7 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸4:1:1:0.1为展开剂展开,取出,晾干后置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。另取芍药苷对照品(购于成都瑞芬思德丹科技有限公司,批号S001002101022),加乙醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。吸取上述两种溶液各7 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸40:5:10:0.2为展开剂展开,取出,晾干后喷以5%香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的蓝紫色斑点。说明该制剂质量稳定可控,可用于后续实验。

1.3 试剂 Tris盐酸缓冲液(北京酷来搏科技有限公司,批号SL30193303);切片石蜡(汇恒化工科技有限公司,批号39601095);小鼠Aβ₁₋₄₀、Tau酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为m1001859-J、m1037981-J);甲苯胺蓝染液(上海如吉科技发展有限公司,批号190118);中性树胶(索莱宝科技有限公司,批

号20190827);TIANGEN粪便基因组DNA提取试剂盒,6×DNA loading buffer(天根生化科技有限公司,批号Q5306,U8113);无水乙醇(致远化学科技有限公司,批号20171113);Midori Green Advance DNA Strain(德国Midori Green公司,批号310718);KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase(美国KAPA Biosystems公司,批号0000112224);AMPure XP(美国Beckman Coulter公司,批号17620100)。

1.4 仪器 Bioprep-6型组织破碎仪(北京奥盛创新科技有限公司);PHY-III型病理组织漂烘仪、TSJ-II型全自动封闭式组织脱水机、BMJ-III型包埋机(常州郊区中威电子仪器厂);BA400Digital型数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);JL-MWGM型Morris水迷宫视频分析系统(上海吉量软件科技有限公司);NovaSeq 6000测序仪(美国Illumina公司);图像分析软件Image-Pro Plus 6.0(美国Media Cybernetics公司);Qubit2.0型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪、Multiskan Go型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);N50T型超微量核酸分析仪(德国Implen公司);HI1210型摊片机、RM2245型切片机、EG1150型包埋机、ST5010型全自动染色机、DM500型普通光学显微镜(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 分组及与给药 采用随机数字表法将24只SAMP8快速衰老小鼠随机分为4组,即模型组及DSS低、中、高剂量组,每组6只;6只SAMR1正常老化小鼠,为正常组。根据人与小鼠体表面积折算等效剂量比值及课题组既往实验研究确定DSS低(14.4 g·kg⁻¹·d⁻¹)、中(28.8 g·kg⁻¹·d⁻¹)、高(57.6 g·kg⁻¹·d⁻¹)剂量组给药剂量^[12];模型组和正常组采用等容积生理盐水灌胃(10 mL·kg⁻¹·d⁻¹);每日灌胃1次,连续8周。

2.2 样本采集及指标检测

2.2.1 Morris水迷宫检测学习记忆能力 连续灌胃8周后,进行Morris水迷宫测试检测小鼠定位航行和空间探索能力。第1~5天进行定位航行实验,记录其在限定时间内(60 s)找到平台所用的时间(逃避潜伏期);第6天进行空间探索实验,记录小鼠60 s内准确穿越平台次数及目标平台象限停留时间。具体实验步骤参考课题组既往实验研究^[12]。每天行为学检测均在同一时间完成。记录并分析各组小鼠逃避潜伏期及60 s内在目标象限停留时间和准确穿越平台次数。

2.2.2 粪便及组织样本获取 药物干预后第56天,收集小鼠新鲜粪便。戴一次性无菌手套,左手抓住小鼠,右手轻轻柔按揉小鼠腹部,刺激排便。当有粪便排出时,用镊子夹取粪便2~3粒,置于灭菌冻存管,液氮保存。行为学测试结束3 h后,参考文献资料[12]处死小鼠,取左脑,制备石蜡切片(片厚约4 μm),行尼氏染色;取右脑,分离海马组织后,置-80 $^{\circ}\text{C}$ 存放,行ELISA检测。

2.2.3 尼氏染色观察海马CA1区病理变化 取石蜡切片,常规脱蜡至水,放置经预热至50 $^{\circ}\text{C}$ 的1%甲苯胺蓝水溶液中,56 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中染20 min;蒸馏水洗;70%乙醇浸泡1 min;95%乙醇分化,镜下控制,以尼氏小体显示清晰为度;无水乙醇迅速脱水;二甲苯透明,中性树脂封固。采用BA200Digital数码相机三目摄像显微系统对切片采集图像,每张切片先于40倍下观察全部组织,选择观察区域内采集3张400倍图片,Image-Pro Plus 6.0软件处理图像。

2.2.4 ELISA检测海马组织 $A\beta_{1-40}$ 和p-Tau表达水平 取海马组织,生理盐水洗净,滤纸吸干,称重,加入4 $^{\circ}\text{C}$ RIPA裂解液(质量体积比1:10),电动匀浆机制备10%组织匀浆,转移到微型离心管中,离心(12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$,20 min,离心半径8.55 cm),取上清液,分装至微型离心管,置-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。参考文献[12]采用ELISA测定海马组织 $A\beta_{1-40}$ 和p-Tau蛋白含量。实验步骤严格按照ELISA试剂盒说明书操作,450 nm波长检测吸光度A。

2.2.5 小鼠粪便DNA提取及PCR扩增 所有样本采用Qiagen PowerFecal Pro Kit纯化小鼠粪便总DNA,纯化DNA后使用1%琼脂糖凝胶电泳检测基因

组DNA完整性、Qubit对DNA进行定量。定量后的DNA使用KAPA HiFi扩增16S V4区(U515F/U806R)获取扩增子。每个样本PCR技术重复3次,取线性期PCR产物等量混合后用于DNA测序文库构建。

2.2.6 高通量测序及生物信息分析 采用Illumina Novaseq 6000高通量测序平台对检测合格的文库进行测序,采用Flash拼接双端序列。使用Sabre基于Barcode从拼接序列中拆分出各样品序列,并截去Barcode序列;QIIME2 v2020.7进行质控去除低质量序列;QIIME2内置deblur方法进行序列降噪和嵌合体去除,构建ASV特征表,去除低频率ASV以降低假阳性结果;Silva v138数据库进行基于naïve Bayes的物种注释,构建进化树。应用R语言软件(R. v3.6.3)进行菌群群落组成、 α 多样性、 β 多样性、差异物种及Pearson相关性分析。

2.3 统计学分析 采用SPSS 24.0统计软件分析数据,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,先进行正态分析和方差齐性检验,若二者均符合,组间比较采用单因素方差分析;若不符合正态分布或方差齐性检验,采用非参数秩和检验,相关性采用Pearson相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对SAMP8小鼠行为学的影响 与正常组SAMR1小鼠比较,模型组SAMP8小鼠逃避潜伏期延长、穿越平台象限次数和在目标象限停留时间均明显减少($P<0.05$);与模型组比较,DSS中、高剂量组SAMP8小鼠逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$)、穿越平台象限次数和在目标象限停留时间均明显增加,差异有明显统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 DSS对SAMP8小鼠定位航行能力和空间探索能力的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of DSS on place navigation and spatial capacity in SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	逃避潜伏期/s	穿越平台象限次数/次	目标象限停留时间/s
正常组		14.56 \pm 3.41	3.40 \pm 0.89	30.80 \pm 3.57
模型组		45.86 \pm 8.62 ¹⁾	1.00 \pm 0.71 ¹⁾	8.72 \pm 5.34 ¹⁾
DSS低剂量组	14.4	34.68 \pm 5.97	2.20 \pm 0.84	15.68 \pm 4.68
DSS中剂量组	28.8	25.22 \pm 3.03 ²⁾	2.80 \pm 0.84 ²⁾	20.40 \pm 2.34 ²⁾
DSS高剂量组	57.6	28.10 \pm 6.34 ²⁾	2.60 \pm 1.14 ²⁾	17.08 \pm 3.13 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表2-表5同)

3.2 对SAMP8小鼠海马CA1区神经元内尼氏小体的影响 正常组小鼠海马CA1区神经元锥体细胞呈圆形或椭圆形,排列整齐、层次清晰、形态完整,核仁清晰,染色质均匀,胞内尼氏小体染色清晰;与正常组比较,模型组锥体细胞排列紊乱、层次疏松,

大量细胞坏死、核碎裂,神经元严重缺失,胞内尼氏小体数量明显减少($P<0.05$);与模型组比较,DSS低、中、高剂量组CA1区神经元细胞多排列整齐、形态完整,少见坏死、变性,胞内尼氏小体数量明显增多($P<0.05$)。见图1、表2。

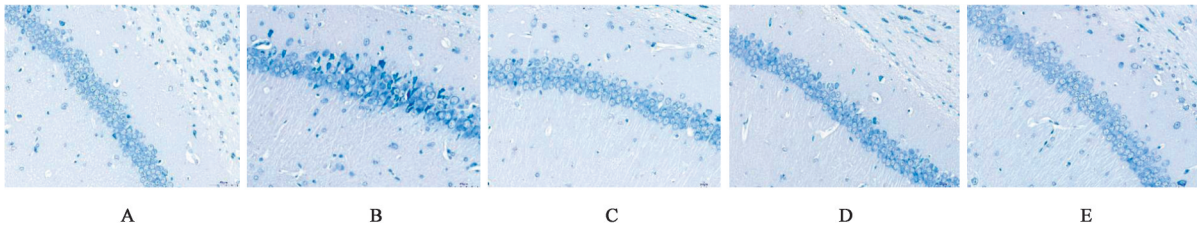


图1 DSS对SAMP8小鼠海马CA1区尼氏小体水平的影响(尼氏, ×400)

Fig. 1 Effect of DSS on hippocampal CA1 Nissl body in SAMP8 mice (Nissl, ×400)

表2 DSS对SAMP8小鼠海马组织CA1区尼氏小体的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of DSS on Nissl body expressions of hippocampal CA1 in SAMP8 mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	400倍视野/个
正常组		73.44±5.42
模型组		35.78±29.79 ¹⁾
DSS低剂量组	14.4	65.89±16.41 ²⁾
DSS中剂量组	28.8	71.45±6.67 ²⁾
DSS高剂量组	57.6	69.33±1.16 ²⁾

3.3 对SAMP8小鼠海马组织Aβ和p-Tau表达水平的影响 与正常组比较,模型组SAMP8小鼠海马Aβ和p-Tau表达水平明显增加($P<0.05$);与模型组比较,DSS中、高剂量组Aβ表达水平均明显降低,DSS低、中、高剂量组p-Tau表达水平明显降低($P<0.05$)。见表3。

表3 DSS对SAMP8小鼠海马组织Aβ和p-Tau表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of DSS on Aβ and p-Tau protein expressions in hippocampus of SAMP8 mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Aβ/μg·g ⁻¹	p-Tau/ng·g ⁻¹
正常组		44.80±2.07	16.66±5.63
模型组		75.34±11.10 ¹⁾	39.28±3.74 ¹⁾
DSS低剂量组	14.4	66.38±18.63	24.36±8.09 ²⁾
DSS中剂量组	28.8	48.22±5.90 ²⁾	18.03±3.81 ²⁾
DSS高剂量组	57.6	54.81±10.18 ²⁾	18.46±9.57 ²⁾

3.4 对SAMP8小鼠肠道菌群多样性的影响

3.4.1 对SAMP8小鼠肠道菌群α和β多样性的影响 稀释曲线出现平台期提示样本测序深度达标。α多样性反映单个样品内部的物种多样性,可通过Shannon指数来衡量。此指数数值越大,说明样品物种多样性越高。与正常组比较,模型组小鼠肠道菌群α多样性Shannon指数明显降低($P<0.05$);与模型组比较,DSS低、中、高剂量组Shannon指数明

显升高($P<0.05$)。β多样性主要是利用各样本的物种组成及丰度信息来反映样本间的关系。主坐标分析(PCoA)可对多个变量进行线性变换,将复杂数据降维简化的同时,最大程度保持了原有数据信息,以揭示数据中隐含的最主要结构和趋势。基于PCoA的结果,将多维数据的差异呈现在二维坐标图上,颜色相同的点表示同一分组,点间距离越近提示群落构成差异越小,样品群落组成越相似。正常组与模型组距离较远,提示与正常组比较,模型组小鼠菌群组成结构发生显著变化;DSS中、高剂量组均与正常组距离较近、与模型组距离较远,且DSS中剂量组更接近正常组,提示与模型组比较,DSS药物干预后的菌群群落物种构成有显著变化。见增强出版附加材料。

3.4.2 对SAMP8小鼠肠道菌群结构的影响 在门水平上,将相对丰度大于1%的门定义为优势物种。在各组小鼠肠道菌群群落结构中,拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)均为优势物种;与正常组比较,模型组小鼠肠道菌群厚壁菌门丰度降低,拟杆菌门、变形菌门丰度升高($P<0.05$);与模型组比较,DSS各剂量组均可上调厚壁菌门丰度,下调拟杆菌门、变形菌门丰度,中、高剂量组差异具有统计学意义($P<0.05$)。在非优势物种中,与正常组比较,模型组螺旋菌门(Spirochaetae)、软壁菌门(Tenericutes)、迷踪菌门(Elusimicrobia)、脱铁杆菌门(Deferribacteres)相对丰度升高;与模型组比较,DSS干预后可下调螺旋菌门、软壁菌门、迷踪菌门、脱铁杆菌门丰度,以DSS中剂量组最显著($P<0.05$)。见增强出版附加材料。

在属水平上,与正常组比较,模型组乳酸杆菌属(Lactobacillus)、Butyricimonas菌属、普氏菌属9(Prevotella 9)、瘤胃球菌9属(Ruminiclostridium 9)丰度显著下降,拟杆菌属(Bacteroides)、幽门螺杆菌属(Helicobacter)、理研菌属(Alistipes)、副杆状菌属(Parabacteroides)、萨特氏菌属(Sutterella)、黏液性

菌属(*Mucispirillum*)丰度显著增加;与模型组比较, DSS低剂量组上调乳酸杆菌丰度,下调拟杆菌属、幽门螺杆菌属、理研菌属、萨特氏菌属、黏液性菌属丰度($P<0.05$), DSS中剂量组上调普氏菌属9、乳酸杆菌、瘤胃球菌9、*Butyricimonas*菌属丰度,下调拟杆菌

属、幽门螺杆菌属、理研菌属、萨特氏菌属、黏液性菌属丰度,差异有明显统计学意义($P<0.05$), DSS高剂量组上调瘤胃球菌9、乳酸杆菌丰度,下调拟杆菌属、幽门螺杆菌属、理研菌属、萨特氏菌属、黏液性菌属丰度,差异有明显统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表4 DSS对SAMP8小鼠肠道菌群属分类水平相对丰度的影响

Table 4 Effect of DSS on relative abundance of gut microbiota at the level of genus in SAMP8 mice

组别	剂量/g·kg ⁻¹	普氏菌属9	乳酸杆菌属	瘤胃球菌9属	拟杆菌属	幽门螺杆菌属
正常组		0.146±0.023	0.039±0.025	0.028±0.004	0.058±0.025	0.011±0.001
模型组		0.053±0.024 ¹⁾	0.004±0.001 ¹⁾	0.011±0.001 ¹⁾	0.104±0.013 ¹⁾	0.052±0.017 ¹⁾
DSS低剂量组	14.4	0.086±0.014	0.017±0.008 ²⁾	0.015±0.002	0.052±0.013 ²⁾	0.017±0.005 ²⁾
DSS中剂量组	28.8	0.128±0.049 ²⁾	0.019±0.004 ²⁾	0.021±0.002 ²⁾	0.048±0.012 ²⁾	0.019±0.005 ²⁾
DSS高剂量组	57.6	0.069±0.047	0.017±0.006 ²⁾	0.018±0.003 ²⁾	0.052±0.020 ²⁾	0.018±0.010 ²⁾
组别	剂量/g·kg ⁻¹	理研菌属	萨特氏菌属	黏液性菌属	<i>Butyricimonas</i>	
正常组		0.008±0.004	0.004±0.002	0.001±0.000	0.003±0.002	
模型组		0.028±0.012 ¹⁾	0.010±0.001 ¹⁾	0.002±0.000 ¹⁾	0.001±0.000 ¹⁾	
DSS低剂量组	14.4	0.013±0.006 ²⁾	0.004±0.001 ²⁾	0.000±0.000 ²⁾	0.002±0.000	
DSS中剂量组	28.8	0.009±0.003 ²⁾	0.004±0.001 ²⁾	0.001±0.000 ²⁾	0.003±0.000 ²⁾	
DSS高剂量组	57.6	0.009±0.004 ²⁾	0.005±0.001 ²⁾	0.000±0.000 ²⁾	0.002±0.001	

3.4.3 小鼠肠道菌群属水平-DSS改善AD认知功能的相关性分析 将属水平丰度显著差异的菌种与SAMP8小鼠逃避潜伏期、尼氏小体数量、A β 及p-Tau蛋白含量等AD认知功能相关生物学指标进行Pearson相关性分析。热图中红色的颜色表示正相关,蓝色表示负相关,颜色深浅与相关性强弱呈一致性。结果表明,乳酸杆菌、普氏菌属9、*Butyricimonas*的丰度与尼氏小体数量呈正相关,与逃避潜伏期、A β 及p-Tau蛋白含量呈负相关;瘤胃球菌9与A β 及p-Tau蛋白含量呈负相关;粘液性菌属、幽门螺杆菌属、理研菌属、萨特氏菌属和拟杆菌属丰度与尼氏小体数量呈负相关;萨特氏菌属、理研菌属、拟杆菌属、幽门螺杆菌属丰度与逃避潜伏期、A β 及p-Tau蛋白含量呈正相关。提示DSS改善AD小鼠认知功能与调控其肠道菌群具有相关性。见增强出版附加材料。

4 讨论

通过调控肠道菌群防治AD是目前研究热点之一。肠道菌群多样性、数量、比例等紊乱均可影响宿主认知功能,导致AD等神经退行性疾病的发生发展^[12-13]。维持其稳态对于宿主生理功能至关重要。健康宿主的肠道菌群结构类似“热带雨林”,研究表明肠道菌群多样性越高,其微生态越稳定。当

处于某些病理状态时,肠道菌群多样性会明显下降,而菌群多样性的改变可触发神经炎症、A β 聚集和Tau蛋白病变^[14-16]。本研究以DSS干预经典AD动物模型SAMP8快速老化小鼠,基于16S rRNA高通量测序技术,获得丰度矩阵后,采用 α 和 β 多样性来描述和评价菌群整体结构。其中, α 多样性反映单个样品内部的菌群物种多样性, β 多样性则利用物种组成及丰度信息来考察不同样品间菌群群落结构的相似性。SAMP8小鼠是目前公认的一种理想的自然发病AD模型,已被广泛应用于研究AD的发病机制^[12]。DSS出自东汉·张仲景所著《金匮要略·妊娠病脉证并治第二十篇》:“妇人怀妊,腹中疝痛, DSS主之”和《金匮要略·妇人杂病脉证并治第二十二篇》:“妇人腹中诸疾病, DSS主之。”本为疗妇人之疾而设,但自上个世纪八十年代末以来已逐渐被广泛用于治疗AD,疗效确切^[9-10]。本研究结果表明,与SAMR1小鼠相比,10月龄SAMP8小鼠的 α 多样性降低, β 多样性与正常组距离较远;DSS干预后能回调模型小鼠肠道菌群 α 多样性与 β 多样性,并降低老化度、提高学习记忆能力、清除海马A β 和p-Tau蛋白异常沉积、改善CA1区病理改变、增加尼氏小体数量,以中剂量组效果最佳。提示DSS改善AD的作用机制可能与调控肠道菌群有关。

肠道菌群处于动态平衡状态,主要由厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、疣微菌门和梭杆菌门等组成,其中又以厚壁菌门与拟杆菌门为主导。研究表明不同疾病的肠道菌群群落组成不同^[18]。HARACH等^[19]研究发现,AD模型小鼠肠道菌群中拟杆菌门丰度明显增高,厚壁菌门、疣微菌门、变形菌门、放线菌门丰度明显降低;VOGT等^[20]研究也表明AD患者肠道拟杆菌门丰度增高、厚壁菌门丰度降低。与之相反,SAJI等^[21]研究报道AD患者肠道拟杆菌属丰度较低,瘤胃球菌属等厚壁菌门丰度较高,厚壁菌/拟杆菌比值升高。前述研究虽在AD肠道菌群门分类丰度变化上呈现不同结果,但均证实肠道菌群中优势菌群组成及丰度变化与AD发病相关。在本研究中,运用分类学组成和聚类学分析发现,与正常组SAMR1比较,模型组SAMP8拟杆菌门、变形菌门丰度升高,厚壁菌门丰度降低,与LI等^[22]研究结果一致;DSS干预后,可降低拟杆菌门、变形菌门丰度,升高厚壁菌门丰度,以中剂量组效果最佳。其改善作用未呈现剂量依赖性,这可能与天然药物的量效关系不是简单的线性关系、不同剂量的药物可能因其成分含量的差异而发挥不同的作用有关^[17]。

在属水平上,DSS可显著上调乳酸杆菌、*Butyricimonas*、普氏菌属9、瘤胃球菌9菌丰度,下调拟杆菌属、幽门螺杆菌属、理研菌、副杆状菌属、萨特氏菌属、黏液性菌属丰度。其中,乳酸杆菌属于厚壁菌门、为益生菌菌株,大量研究报道AD患者肠道乳酸杆菌减少;该菌经发酵可生成对宿主机体有营养保护和抗炎等作用的短链脂肪酸,并抑制炎症反应、调控细胞凋亡、减少脑内A β 沉积、改善记忆学习缺陷^[22-25]。*Butyricimonas*可将葡萄糖转化为丁酸和异丁酸,生成乙酸、丙酸和琥珀酸等短链脂肪酸,减少炎症、促进肠道屏障完整性,AD患者肠道该菌相对丰度明显下降、且与大脑中致病性A β 含量呈负相关^[26]。同时,越来越多的研究表明肠道菌群中的黏液性菌属、副杆状菌属、萨特氏菌属和拟杆菌属的变化与炎症密切相关^[27-29]。MAGNUSSON等^[20,30]发现拟杆菌属的比例与认知功能密切相关,AD患者拟杆菌属丰度与脑脊液YKL-40这一AD生物标志物的含量呈正相关。此外,近年来研究发现幽门螺杆菌感染为AD高风险致病因素,可显著增加海马和皮质A β 沉积,释放促炎性分子和诱导神经细胞凋亡,还可导致tau蛋白过度磷酸化^[31-33]。在本研究中,SAMP8小鼠粪便菌

群在属水平上的改变趋势与这些研究结果一致,说明这些菌属在AD病程中可能发挥着重要作用;DSS干预后,可在一定程度上上调乳酸杆菌、*Butyricimonas*等菌属丰度,下调拟杆菌属、副杆状菌属、萨特氏菌属、黏液性菌属、幽门螺杆菌属等丰度。而肠道菌群属水平—认知能力Pearson相关性分析结果表明,幽门螺杆菌属、黏液性菌属、拟杆菌属和萨特氏菌属的丰度与SAMP8小鼠的认知能力呈负相关,而乳酸杆菌和*Butyricimonas*丰度与SAMP8小鼠的认知能力呈正相关。提示该方改善AD的作用机制可能与上调肠道有益菌属丰度、下调致病菌属丰度以维持菌群多样性与稳定性有关。

综上所述,本研究基于16S rDNA扩增测序技术、结合SAMP8经典早老化动物模型,初步揭示了DSS防治AD的作用机制可能与其改善肠道菌群群落结构及多样性有关。但由于复方成分复杂多样、机体肠道菌群结构与组成也相对复杂,其作用机制仍需深入探讨。此外,近年来研究报道肠道微生物改变和泛素-蛋白酶体系统异常引起的蛋白聚集是AD主要病理标志、蛋白酶体对于维持肠道稳态发挥“守门人”的作用^[34-35],本课题组前期研究结果表明DSS能显著改善SAMP8痴呆小鼠的认知能力,其机制可能与调控泛素-蛋白酶体系统减少A β 和p-Tau异常沉积有关^[12]。综合分析,提示经典方剂DSS干预AD的作用机制具有多途径、多靶点的特点,拟进一步采用多组学技术开展深入研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] DUMURGIER J, SABIA S. Epidemiology of Alzheimer's disease: Latest trends[J]. Rev Prat, 2020, 70(2):149-151.
- [2] ERATNE D, LOI S M, FARRAND S, et al. Alzheimer's disease: Clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis [J]. Australas Psychiatry, 2018, 26(4):347-357.
- [3] DOIFODE T, GIRIDHARAN V V, GENEROSO J S, et al. The impact of the microbiota-gut-brain axis on Alzheimer's disease pathophysiology [J]. Pharmacol Res, 2021, 164:105314.
- [4] CALVANI R, PICCA A, LO MONACO M R, et al. Of microbes and minds: A narrative review on the second brain aging[J]. Front Med (Lausanne), 2018, 5:53.
- [5] 陈付艳,于建春,韩景献. 中医药治疗老年期痴呆进

- 展[J]. 山西中医, 2015, 13(5):56-58.
- [6] 刘兆崇. 基于因子分析的老年性痴呆的中医辨证规律研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2011.
- [7] 水岛宣昭. 当归芍药散对老年痴呆的作用[J]. 和汉医药学会志, 1989, 6(3):456-458.
- [8] 李强, 崔远武, 张玉莲. 中医药治疗老年性痴呆临床应用文献分析[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(7):1207-1210.
- [9] KIM Y, CHO S H. Danggui-Shaoyao-San for dementia: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(4):e18507.
- [10] 陈云慧, 夏军, 刘丹, 等. 当归芍药散治疗阿尔茨海默病的作用机制实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(24):1-7.
- [11] 陈云慧, 夏军, 刘兴隆, 等. 当归芍药散含药血清调控UPP途径对 $A\beta_{1-40}$ 损伤PC12细胞的保护作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(24):17-25.
- [12] 陈云慧, 夏军, 淮文英, 等. 当归芍药散调控泛素-蛋白酶体途径改善SAMP8小鼠认知能力的作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(24):8-16.
- [13] BORSOM E M, LEE K, COPE E K. Do the bugs in your gut eat your memories? Relationship between gut microbiota and Alzheimer's disease[J]. *Brain Sci*, 2020, 10(11):814.
- [14] KESIKA P, SUGANTHY N, SIVAMARUTHI B S, et al. Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease[J]. *Life Sci*, 2021, 264:118627.
- [15] SHABBIR U, ARSHAD M S, SAMEEN A, et al. Crosstalk between gut and brain in Alzheimer's disease: The role of gut microbiota modulation strategies[J]. *Nutrients*, 2021, 13(2):690.
- [16] LING Z, ZHU M, YAN X, et al. Structural and functional dysbiosis of fecal microbiota in Chinese patients with Alzheimer's disease[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:634069.
- [17] 傅延龄. 中药量效关系核心科学问题及其研究思路[J]. 北京中医药, 2016, 35(6):513-516.
- [18] NAGU P, PARASHAR A, BEHL T, et al. Gut microbiota composition and epigenetic molecular changes connected to the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(7):1436-1455.
- [19] HARACH T, MARUNGRUANG N, DUTHILLEUL N, et al. Reduction of A β amyloid pathology in APPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:41802.
- [20] VOGT N M, KERBY R L, DILL-MCFARLAND K A, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):13537.
- [21] SAJI N, NIIDA S, MUROTANI K, et al. Analysis of the relationship between the gut microbiome and dementia: A cross-sectional study conducted in Japan[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):1008.
- [22] LI Z, ZHU H, ZHANG L, et al. The intestinal microbiome and Alzheimer's disease: A review[J]. *Animal Model Exp Med*, 2018, 1(3):180-188.
- [23] IVAKHNIUK T, IVAKHNIUK Y. Intestinal microbiota in Alzheimer's disease[J]. *Georgian Med News*, 2021, (313):94-98.
- [24] SHAMSIPOUR S, SHARIFI G, TAGHIAN F. An 8-week administration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus plantarum* combined with exercise training alleviates neurotoxicity of A β and spatial learning via acetylcholine in Alzheimer rat model[J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(7):1495-1505.
- [25] DEN H, DONG X, CHEN M, et al. Efficacy of probiotics on cognition, and biomarkers of inflammation and oxidative stress in adults with Alzheimer's disease or mild cognitive impairment - a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(4):4010-4039.
- [26] LE ROY T, VAN DER SMISSEN P, PAQUOT A, et al. *Butyricimonas faecalis* sp. nov., isolated from human faeces and emended description of the genus *Butyricimonas*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2019, 69(3):833-838.
- [27] LAVELLE A, LENNON G, O'SULLIVAN O, et al. Spatial variation of the colonic microbiota in patients with ulcerative colitis and control volunteers[J]. *Gut*, 2015, 64(10):1553-1561.
- [28] LOY A, PFANN C, STEINBERGER M, et al. Lifestyle and horizontal gene transfer-mediated evolution of *Mucispirillum schaedleri*, a core member of the murine gut microbiota[J]. *mSystems*, 2017, 2, e00171-e00116.
- [29] DZIARSKI R, PARK S Y, KASHYAP D R, et al. Pglyrp-regulated gut microflora *Prevotella falsenii*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides eggerthii* enhance and *Alistipes finegoldii* attenuates colitis in mice[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0146162.
- [30] MAGNUSSON K R, HAUCK L, JEFFREY B M, et al. Relationships between diet-related changes in the gut microbiome and cognitive flexibility[J]. *Neuroscience*, 2015, 300:128-140.
- [31] DOULBERIS M, KOTRONIS G, GIALAMPRIYOU D, et al. Alzheimer's disease and gastrointestinal

- microbiota, impact of Helicobacter pylori infection involvement [J]. Int J Neurosci, 2021, 131 (3) : 289-301.
- [32] HARRIS S A, HARRIS E A. Herpes simplex virus type 1 and other pathogens are key causative factors in sporadic Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2015, 48(2):319-353.
- [33] WANG X L, ZENG J, YANG Y, et al. Helicobacter pylori filtrate induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation by activating glycogen synthase kinase-3 β [J]. J Alzheimers Dis, 2015, 43(1): 153-165.
- [34] WANG X L, ZENG J, FENG J, et al. Helicobacter pylori filtrate impairs spatial learning and memory in rats and increases β -amyloid by enhancing expression of presenilin-2[J]. Front Aging Neurosci, 2014, 6: 66.
- [35] NARGEH H, ALIABADI F, AJAMI M, et al. Role of polyphenols on gut microbiota and the ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(22): 6119-6144.
- [36] MOHAPATRA G, EISENBERG-LERNER A, MERBL Y. Gatekeepers of the gut: The roles of proteasomes at the gastrointestinal barrier[J]. Biomolecules, 2021, 11 (7): 989.

[责任编辑 周冰冰]

·书讯·

子宫内膜癌的实验室及影像学指标的检测意义

——评《子宫内膜癌100问》

子宫是孕育胎儿和维持女性性别特征的重要器官。子宫内膜癌起源于子宫腔内膜上皮的恶性肿瘤,是原发子宫的恶性肿瘤,主要包括子宫颈癌和子宫内膜癌,也是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤。近年来,子宫内膜癌的发病率越来越高,特别是女性朋友们,日常生活中更需要关注与子宫内膜癌相关的症状和表现,一旦发现异常,如月经异常、异常阴道出血等症状,要及时咨询专业人士或到医院就诊。

《子宫内膜癌100问》由黄胡信,王刚主编,中华医学电子音像出版社2019年10月出版。子宫内膜癌的发病特点决定了其可防可治的临床优势,故需要妇产科医务人员提高对子宫内膜癌临床特点的认识,做到早期诊断、早期治疗,而患者的防治意愿与常识决定了本病的临床进程。该书100个内容为子宫内膜癌最常见的症状,是绝经后出血或围绝经期出血,女性朋友越来越关注自身健康的问题,也是子宫内膜癌患者及其家属急于了解的问题。本书采用问答的方式展示了100个关于子宫内膜癌的相关问题,包含了子宫内膜癌的病理生理、临床特点、病因学、流行病学等相关内容,涉及子宫内膜癌与高血压、糖尿病等代谢紊乱性疾病的关系,以及子宫内膜癌的微创手术治疗、保留生育功能等敏感性话题,这些问题也是子宫内膜癌预防、筛查、诊断、治疗、预后改善的重点。让患者和医务人员时刻明晰子宫内膜癌预防和康复的方向。对患者进行影像学检查,经阴道彩色B超检查可了解子宫大小、子宫腔内有无异常回声、子宫内膜厚度、子宫肌层有无浸润、附件肿物大小及性质,是首选的无创辅助检查办法,MRI或CT检查对诊断子宫内膜癌、判断子宫内膜癌有无侵犯子宫颈、子宫内膜癌侵犯肌层深度、有无腹膜后淋巴结转移等方面均有较高价值,常用于治疗前评估,以指导临床决策。超声检查是用弱超声波照射到身体上,利用人体对超声波的反射将组织的反射波进行图像化处理,通过观察和分析反射波的特征,来判断组织的特性。这是一种在妇科应用广泛的无创性检查方法。应用于妇科的一般是B超,可看到人体内脏各种切面图形。图形直观且清晰,容易发现较小病变。尤其是经阴道超声检查,距靶器官近,对子宫内膜病变的观察较腹部超声更加清晰直观,而且不需充盈膀胱,也不受肥胖、多重反射、肠气等因素的影响,能清晰观察到子宫内膜的厚度,并与内膜的声像形态学改变结合在一起分析,有利于微小病灶的发现。临床建议,常规使用经阴道B超对绝经期前后女性进行子宫内膜监测,可以增加子宫内膜病变的预测性,提高对子宫内膜癌的诊断质量。子宫内膜回声的强弱与肿瘤分化程度有关。分化较好者组织中腺体数量多,超声显示为高回声;反之则显示为不均匀或低回声。MRI可以直接做出横断面、矢状面、冠状面和各种斜面的体层图像,且不会产生CT检测中的伪影,不需注射造影剂,无电离辐射,对机体没有不良影响。相对于CT和超声检查,MRI能更清晰地显示内膜与肌层之间的结合带,根据结合带断裂与否判断是否有浸润,观察浸润肌层的深度,以及是否累及子宫颈管等。值得注意的是,所有病变,包括子宫内膜癌,诊断的唯一金标准就是病理学检查。无论是MRI,还是CT或超声检查,都不是子宫内膜癌的诊断方法,而是评估病情的一种手段。这些检查所获得的信息,可以帮助医师判断和预测肿瘤的临床分期和预后,也可以指导医师制订更适宜的治疗方案。

《子宫内膜癌100问》对于年轻的妇产科医师、护士,以及非妇产科的医护人员,不仅有利于日常工作的开展,也有利于与患者及其家属的沟通,书中的很多内容也可供初级辅助生殖医师参阅,来指导其工作。

[基金项目] 河北省邢台市科技计划项目(2019ZC141)

(作者马立芳¹,贾岚²,李强²,1.邢台医学高等专科学校第一附属医院,河北邢台 054000; 2.河北省宁晋县医院,河北邢台 055550)