

# 罗伊氏乳酸杆菌 SL001 对 AD 模型小鼠和 C57BL/6 小鼠肠道微生物的影响

刘梅梅<sup>1</sup>, 胡汝倩<sup>1</sup>, 郭耀文<sup>1</sup>, 孙卫忠<sup>2</sup>, 李建涛<sup>1</sup>, 范明亮<sup>1</sup>, 王燕<sup>1</sup>, 杜华茂<sup>1</sup>, 唐志如<sup>2</sup>, 柴春利<sup>1</sup>

1 西南大学 生物技术学院, 重庆 400715

2 西南大学 动物科技学院, 重庆 400715

刘梅梅, 胡汝倩, 郭耀文, 等. 罗伊氏乳酸杆菌 SL001 对 AD 模型小鼠和 C57BL/6 小鼠肠道微生物的影响. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1887-1898.

Liu MM, Hu RQ, Guo YW, et al. Influence of *Lactobacillus reuteri* SL001 on intestinal microbiota in AD model mice and C57BL/6 mice. Chin J Biotech, 2020, 36(9): 1887-1898.

**摘要:** 本研究旨在调查阿尔茨海默症模型小鼠 (APP/PS1 双转基因小鼠, AD 小鼠) 与野生型小鼠 (C57BL/6 小鼠) 肠道菌群的多样性差异, 以及添食罗伊氏乳酸杆菌 SL001 (*Lactobacillus reuteri* SL001) 对两种小鼠肠道微生物菌群结构组成的影响, 探讨其是否可对 AD 小鼠起到积极的改善作用。首先将雄性 AD 模型和野生型小鼠分别分成添食组和未添食组 (每组 5 只), 添食组小鼠每天用 0.2 mL 浓度为  $5 \times 10^{11}$  CFU/mL 的 *L. reuteri* SL001 菌悬液灌胃, 未添食组则每天接受等量的无菌 PBS, 通过口服管饲法进行给物, 周期为 45 d。实验结束后, 采集小鼠的粪便样本, 通过高通量测序技术测定了 16S rRNA V3-V4 区序列, 并对群落结构和多样性进行比较分析。结果显示 4 个处理组小鼠的肠道微生物 OTUs 总共包括 19 个门、40 个纲、64 个目、104 个科和 175 个属。AD 模型小鼠的  $\alpha$  多样性大于野生型小鼠, 但是两者之间的差异不显著。添食 *L. reuteri* SL001 后, 两种小鼠的  $\alpha$  多样性均增加, AD 模型小鼠的增幅较小。在门水平上, 4 组小鼠的优势菌门均为拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和变形菌门 (Proteobacteria), AD 模型小鼠中的拟杆菌门丰度低于野生型, 厚壁菌门的丰度高于野生型, 添食 *L. reuteri* SL001 会降低小鼠的厚壁菌门/拟杆菌门的比例 (F/B)。在目水平上, AD 模型小鼠中的拟杆菌目 (Bacteroidales)、乳酸杆菌目 (Lactobacillales)、芽胞杆菌目 (Bacillales) 和双歧杆菌目 (Bifidobacteriales) 的相对丰度低于野生型小鼠。在属水平上, 丰度较高的属有 *Allobaculum*、毛螺旋菌属 (*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、乳酸菌属 (*Lactobacillus*)。AD 模型小鼠的拟杆菌属、乳酸菌属、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、和拟普雷沃菌属 (*Alloprevotella*) 的相对丰度低于野生型小鼠, 添食 *L. reuteri* SL001 会增加这些属以及拟杆菌目、乳酸杆菌目、芽胞杆菌目和双歧杆菌目在 AD 模型小鼠中的丰

Received: January 12, 2020; Accepted: June 24, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31670123, 31772610), National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFD0501000), Chongqing Key Innovation Project for Overseas Students (No. cx2017024), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. XDJK2013C097).

Corresponding author: Chunli Chai. Tel: +86-23-68250173; Fax: +86-23-68250191; E-mail: chail@swu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31670123, 31772610), 国家重点研发计划 (No. 2018YFD0501000), 重庆市留学人才创新计划重点项目 (No. cx2017024), 中央高校基本科研业务费 (No. XDJK2013C097) 资助。

网络出版时间: 2020-07-07

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200706.1326.002.html>

度。AD模型小鼠的丁酸弧菌属 (*Butyrivibrio*) 相对丰度也低于野生型, 添食 *L. reuteri* SL001 后, 其相对丰度在两种小鼠中均出现降低。野生型小鼠的优势菌种为杆菌纲 (Bacilli) 中的乳酸杆菌科 (Lactobacillaceae), AD模型小鼠中未发现优势菌群, 这一结果与不同比例物种分类树结果相符。文中结果揭示了AD模型小鼠与野生型小鼠肠道微生物多样性差异, 也表明添食 *L. reuteri* SL001 可以改善小鼠肠道细菌群落结构组成, 对AD模型小鼠能够起到一定程度的积极调整作用。

**关键词:** 阿尔茨海默症模型小鼠, 罗伊氏乳酸杆菌 SL001, 微生物多样性

## Influence of *Lactobacillus reuteri* SL001 on intestinal microbiota in AD model mice and C57BL/6 mice

Meimei Liu<sup>1</sup>, Ruqian Hu<sup>1</sup>, Yaowen Guo<sup>1</sup>, Weizhong Sun<sup>2</sup>, Jiantao Li<sup>1</sup>, Mingliang Fan<sup>1</sup>, Yan Wang<sup>1</sup>, Huamao Du<sup>1</sup>, Zhiru Tang<sup>2</sup>, and Chunli Chai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

<sup>2</sup> College of Animal Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** We studied the influence of *Lactobacillus reuteri* SL001 (*L. reuteri* SL001) on the gut microbial community in Alzheimer's disease model mice (*APP/PS1* double transgenic mice, ADmice) and wild type (C57BL/6) mice. The AD model mice and wild type mice were divided into test and control groups (4 in total), with 5 mice each and only male mice. The test group was fed with 0.2 mL suspension of *L. reuteri* SL001 at  $5 \times 10^{11}$  CFU/mL. The control group received the same amount of sterile PBS daily for 45 days. Fecal samples were collected to compare and analyze the community structure and diversity of microbiota through high-throughput sequencing of the V3-V4 region of 16S rRNA gene. By sequence alignment and classification, the intestinal microbial OTUs of the 4 groups including 19 phyla, 40 classes, 64 orders, 104 families and 175 genera. The  $\alpha$  diversity of AD model mice was greater than that of wild type mice, but the difference between the two was small. After adding *L. reuteri* SL001, the  $\alpha$  diversity of both mice increased, and the increase in AD model mice was smaller. At the phyla level, the dominant phyla of the four groups of mice were Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria. The abundance of Bacteroides phylum in AD model mice was lower than that of wild type, and the abundance of chlamydomonas was higher than that of wild type. Feeding *L. reuteri* SL001 reduced the proportion of Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) in mice. At the order level, the relative abundance of Bacteroidales, Lactobacillales, Bacillales and Bifidobacteriales in AD model mice was lower than that of wild type mice. At the genus level, the abundant genera were *Allobaculum*, *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*, *Bacteroides* and *Lactobacillus*. The relative abundance of *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Alloprevotella* in AD model mice was lower than that in wild type mice. Adding *L. reuteri* SL001 increased the abundance of these genera and Bacteroides, Lactobacillus, Bacillus and Bifidobacteria in AD model mice. The relative abundance of *Butyrivibrio* in AD model mice was also lower than that in wild type, but after the feeding of *L. reuteri* SL001, the relative abundance was reduced in both mice. The dominant strains of wild-type mice were *Lactobacillus*, and no dominant flora was found in AD model mice. The results in this article provide valuable data for revealing the difference in intestinal microbial diversity between AD model mice and C57BL/6 mice, and feeding *L. reuteri* SL001 play positive roles in adjusting the intestinal bacterial community structure of AD model mice.

**Keywords:** Alzheimer's disease model mice, *Lactobacillus reuteri* SL001, microbial diversity

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经退行性疾病, 具有年龄相关性, 其临床表现为进行性认知障碍, 始于记忆力的恶化, 影

响正常生活并最终导致残疾甚至死亡<sup>[1-3]</sup>。目前对AD的发病机制主要有两个假说: A $\beta$  沉积假说和Tau蛋白过度磷酸化假说<sup>[4-5]</sup>。令人遗憾的是, 目

前以这两种假说为中心的治疗策略持续失败。最近,越来越多的研究表明,肠道微生物(Gut microbes, GM)与AD之间存在紧密的联系<sup>[6-8]</sup>。与常规饲养的AD模型小鼠相比,无菌AD模型小鼠表现出异常的肠胃蠕动,并且脑中A $\beta$ 沉积急剧降低。将常规饲养的AD模型小鼠的粪便微生物菌群定殖到无菌AD模型小鼠中,小鼠脑中的A $\beta$ 水平增加。相比之下,来自对照野生型小鼠的微生物菌群定殖却不会造成A $\beta$ 水平的增加<sup>[9]</sup>。长期的广谱抗生素治疗也可使AD模型小鼠的肠道微生物多样性发生紊乱,进而引发脑部A $\beta$ 斑块沉积和小胶质细胞形态发生改变<sup>[10]</sup>。近来的临床试验表明,幽门螺杆菌*Helicobacter pylori*感染的AD患者具有更严重的认知障碍,根除幽门螺杆菌可以延长AD患者的生存期<sup>[11]</sup>。GV-971药物已通过临床III期试验,发现其可以重塑AD患者的肠道微生物,降低大脑的炎症反应,进而改善了认知功能的下降<sup>[12]</sup>,该结果进一步证明了肠道微生物在AD发展中的重要作用,因此可以将GM作为AD治疗的潜在新靶标。

益生菌作为生物治疗剂具有改善肠道环境、抗肥胖、预防癌症和感染等功效<sup>[13-14]</sup>。一些益生菌也可以通过微生物-肠-脑轴(Microbe-gut-brain axis, MGB)影响中枢神经系统(Central nervous system, CNS)。MGB轴是一种双向通讯系统,而作为MGB轴核心的微生物,可通过神经、内分泌、代谢和免疫途径影响中枢神经系统<sup>[15]</sup>。已有研究结果显示一部分乳酸杆菌可以影响肠道神经元的兴奋性和结肠运动性,并且降低血浆中炎症因子水平,缓解小鼠的焦虑行为<sup>[16]</sup>。在AD患者脑内检测到 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)浓度的降低,而短乳杆菌和齿状双歧杆菌可通过谷氨酸代谢途径产生GABA,增加其在脑内的含量,减少神经损伤<sup>[17]</sup>。益生菌治疗还可以挽救AD模型小鼠的认知缺陷,改善某些代谢状态<sup>[18]</sup>。综上所述,

某些益生菌可能能够安全有效地治疗AD。

在本研究中,我们对AD模型小鼠与野生型小鼠的肠道微生物群落差异进行了调查,并分析添食罗伊氏乳酸杆菌SL001(*Lactobacillus reuteri* SL001, *L. reuteri* SL001)对两种小鼠肠道微生物菌群结构的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 罗伊氏乳酸杆菌SL001菌液制备

*L. reuteri* SL001 (NCBI 登录号 KU255544.1; 菌种保藏号 CCTCC M 2019122) 为本实验室前期从家兔胃液内容物中筛选所得。该菌株为革兰氏阳性杆状细菌,在MRS培养基上呈白色圆形,中央凸起,边缘整齐。同时,该菌株具有耐酸、耐胆盐、分解胆固醇的特点。在MRS培养基中培养*L. reuteri* SL001,离心收集细胞沉淀,并用PBS (pH 7.4) 洗涤。将收集的沉淀物以 $5 \times 10^{11}$  CFU/mL的浓度重悬于PBS中以供实验使用。

### 1.2 动物试验

*APP/PS1* 双转基因小鼠 (C57BL/6 background) 购于南京大学模式动物研究所,野生型 (C57BL/6 品系) 小鼠购自重庆中医药研究院。将7月龄20g左右的雄性*APP/PS1*双转基因小鼠和野生型小鼠随机分为4组,每组5只:AD小鼠添食组(PT)、AD小鼠未添食组(PC)、野生型小鼠添食组(NT)、野生型小鼠未添食组(NC)。添食组小鼠每天用0.2 mL的*L. reuteri* SL001菌悬液灌胃,未添食组则每天接受等量的无菌PBS,每天早上9点通过口服管饲法进行给物处理,周期为45 d。将小鼠分笼饲养,室内适度通风,室温25 $^{\circ}$ C,12 h光照/12 h黑暗循环,自由饮用食物和水。

### 1.3 小鼠粪便16S rRNA

添食结束后所有小鼠禁食12 h,经乙醚麻醉后解剖,取直肠粪便,液氮冻存以备使用。采用TIANamp基因组提取试剂盒(TIANGEN Biotech

LTD) 提取小鼠粪便 DNA, PCR 扩增 16S rRNA V3-V4 片段, 引物序列为 341-F (5'-CCTAYGGG RBGCASCAG-3') 和 806-R (5'-GGACTACNNGG GTATCT-3')<sup>[19-20]</sup>。反应条件: 预变性 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 最终延伸 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收试剂盒 (Qiagen, Germany) 纯化目的片段, 送北京诺禾致源生物有限公司用 Illumina MiSeq 250 平台测序。

#### 1.4 小鼠肠道菌群分析

16S rRNA 测序后拼接成 Tag, 并根据 Tag 进行物种分类、OTU 分析、多样性分析和多样品的比较分析等。利用 Mothur 对测序序列进行去冗余处理, 使用基于 Naive Bayesian 的分类器 RDP Classifier 工具对 Tag 进行物种注释。计算 97% 相似度下的 OTU 数量, 并根据众数原则对 OTU 进行物种注释。采用 PICRUST 进行 OTU pathway 注释, 以 Mothur 进行样品  $\alpha$  多样性分析; 采用 R 软件进行热图分析、 $\beta$  多样性分析、样品聚类分析和维恩图的绘制; 采用 SPSS 21 软件中的双因素方差分析检验两个处理组之间的统计学差异, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序数据

经整理, 4 个处理组 20 只小鼠肠道微生物的 16S rRNA 基因扩增子的 Illumina MiSeq 250 测序对样品产生 84 694–100 129 个原始读数。在质量过滤和去除嵌合序列后, 每个样品保留 80 010–92 264 个读数, 以 97% 相似度划分, 可以分配给 1 176 个 OTUs。根据 OTU 数据, 绘制稀疏曲线, 由图 1 可以看出, 稀疏曲线的末端趋于平坦并且在 0.03 相异截止值下, 所有样品的测序深度指数覆盖率均高于 99.7% (表 1)。这些结果表明我们的抽样量充分, 并且测序结果捕获了小鼠肠道微生物群落的大部分多样性。根据物种注释的结果, 将来自小

鼠粪便样本中所有的 OTU 分为对应的域, 包括了 19 个门、40 个纲、64 个目、104 个科和 175 个属。由表 1 可以看出, OTU 数目 NT 组 > PT 组 > PC 组 > NC 组, 表明添食 *L. reuteri* SL001 可以增加小鼠肠道微生物种类。

### 2.2 小鼠肠道细菌群落的多样性分析

#### 2.2.1 Alpha 多样性分析

由表 1 可知, 在 ACE、Chao1、Shannon、Simpson 等  $\alpha$  多样性指数中, NT > NC, PT > PC, 这揭示了添食 *L. reuteri* SL001 可以增加小鼠肠道菌群的多样性。在 PC 与 NC 中, 前者 ACE、Chao1、Shannon、Simpson 等  $\alpha$  多样性指数更高, 表明未添食 AD 模型小鼠的肠道微生物多样性比野生型高; 在 PT 与 NT 中, ACE、Chao1、Shannon、Simpson 等指数差异很小 (甚至后者更大), 说明野生型小鼠对 *L. reuteri* SL001 添食更敏感。AD 模型小鼠的肠道微生物多样性比野生型丰富, 添食 *L. reuteri*

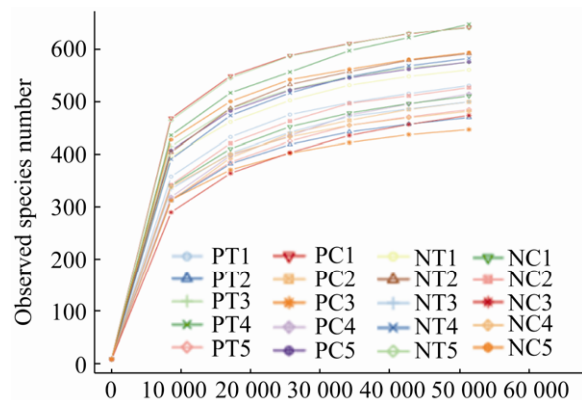


图 1 样品物种的稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curve analyses of sample.

表 1 小鼠肠道微生物丰度和多样性指数

Table 1 Intestinal microbial abundance and alpha-diversity index in mice

Group	OTU	ACE	Chao1	Shannon	Simpson	Goods coverage
NC	517	564.396	564.614	5.933	0.947	0.999
NT	575	614.395	613.623	6.563	0.976	0.999
PC	536	582.516	580.709	6.062	0.955	0.999
PT	541	590.900	625.310	6.358	0.974	0.997

SL001 可以略微增加小鼠肠道菌群的多样性,并且在野生型小鼠中的涨幅较大。

### 2.2.2 Beta 多样性分析

由图 2 可以看出, NT 组和 PT 组表现出了较明显的组内聚集,样品根据所处组别相互聚集到一起, NC 组和 PC 组并没有依据其组别明显聚集, 添食组的组内微生物结构与组成的相似性高于未添食组,说明添食 *L. reuteri* SL001 可以在一定程度上减少组内个体间的差异。

由图 3 可知, PC 组和 NC 组 (图 3A) 之间,组内差异大于组间差异,但不显著 ( $R=-0.052$ ,  $P=0.538$ )。PT 组与 NT 组 (图 3B) 之间,组间差异大于组内差异 ( $R=0.184$ ,  $P=0.11$ ),表明添食 *L. reuteri* SL001 可以使同种小鼠的肠道微生物更趋于一致,保持更稳定的状态。

如图 4 所示,4 个处理组小鼠共聚为两大分支, PC 组和 NC 组之间的细菌群落结构相似性较高,

共同聚集在上方, PT 组和 NT 组之间的细菌群落结构相似性较高,共同聚集在下方,说明添食 *L. reuteri* SL001 可以造成不同基因型小鼠肠道微生物群落结构发生相似的改变。

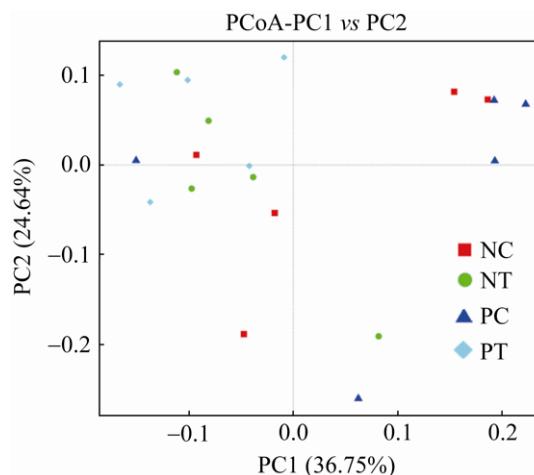


图 2 PCoA 聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis by principal co-ordinates analysis.

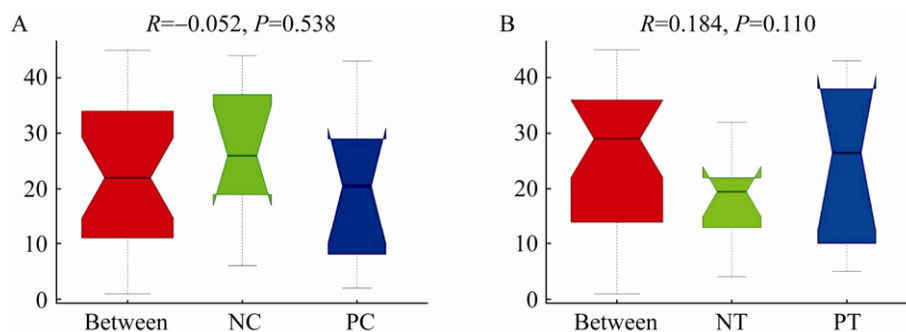


图 3 小鼠肠道细菌群落的 Anosim 分析 (A: NC 组与 PC 组间比较; B: NT 组与 PT 组间比较)

Fig. 3 Anosim analysis of intestinal bacterial community in mice. (A) Comparison between NC group and PC group. (B) Comparison between NT group and PT group.

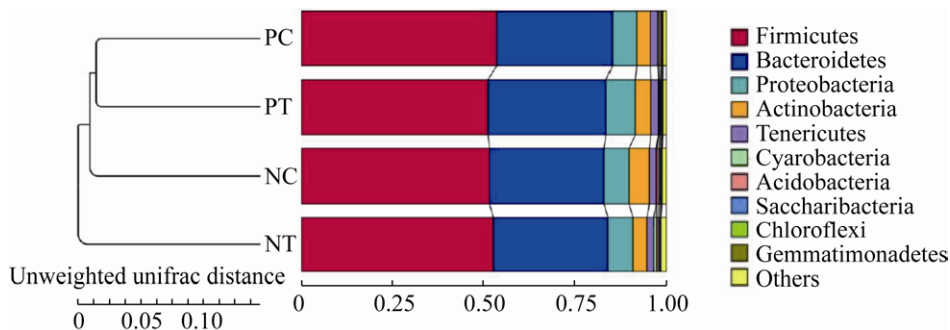


图 4 小鼠肠道细菌群落聚集分析图

Fig. 4 Clustering analysis of mice intestinal bacterial community.

## 2.3 样品群落组成分析

### 2.3.1 物种维恩图分析

由维恩图 (图 5) 可知, 4 个处理组之间共有的 OTU 数目为 667 个, 占绝大多数。NT 组独有 OTU 数目最多, 为 93 个, PC 组独有的 OTU 数目最少, 仅有 28 个, PT 组和 NC 组独有 OTU 数目分别为 50 个和 54 个, 即 AD 模型小鼠初始肠道菌群丰富度小于野生型小鼠, 而添食 *L. reuteri* SL001 能增加肠道菌群丰富度, 野生型小鼠尤为显著。另外, AD 模型小鼠添食后, 与野生型小鼠未添食组之间的共有 OTU 数目增加。这可以说明添食 *L. reuteri* SL001 能够改变小鼠肠道微生物结构组成, 增加独有物种, 丰富物种多样性, 也可以使 AD 模型小鼠的肠道微生物组成更接近于正常小鼠。

### 2.3.2 细菌门分类水平的比较

4 组小鼠粪便微生物中的优势菌群均为拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和厚壁菌门 (Firmicutes), 这两个菌门序列约占序列总数 92% (图 6A)。AD 模型小鼠中的拟杆菌门丰度低于野生型, 厚壁菌门的丰度高于野生型, 添食 *L. reuteri* SL001 会增加拟杆菌门所占比例, 且 PT 组与 PC 组之间 (68.54% vs 49.20%,  $P<0.05$ )、PT 与 NC 之间 (68.54% vs 54.38%,  $P<0.01$ ) 存在显著性差异。相反, 添食 *L. reuteri* SL001 会降低厚壁菌门所占的比例, 而且

PT 与 PC 之间 (24.15% vs 42.80%,  $P<0.05$ )、PT 与 NC 之间 (24.15% vs 38.12%,  $P<0.05$ ) 存在显著性差异。为了更直观地展现两种菌门的占比差异, 统计了厚壁菌门与拟杆菌门的比值 (图 6B)。其中 PC 组小鼠的 F/B 比值显著高于 NC 组, 添食 *L. reuteri* SL001 会降低比值且 PT 组比值最小, 并且 PT 组分别与 PC 组、NC 组之间有显著性统计学差异。

### 2.3.3 细菌目分类水平的比较

从图 7 可以看出, 在目的水平上, 拟杆菌目 (Bacteroidales) 的相对丰度最大, 并且 AD 模型小鼠的相对丰度低于野生型小鼠, 添食 *L. reuteri*

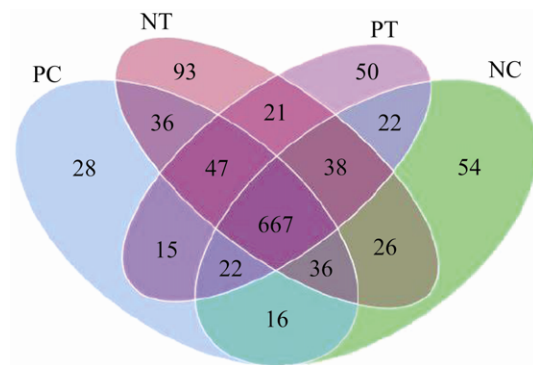


图 5 小鼠肠道微生物 OTU 程度的维恩图

Fig. 5 Venn diagram of OTU degree of intestinal microorganisms in mice.

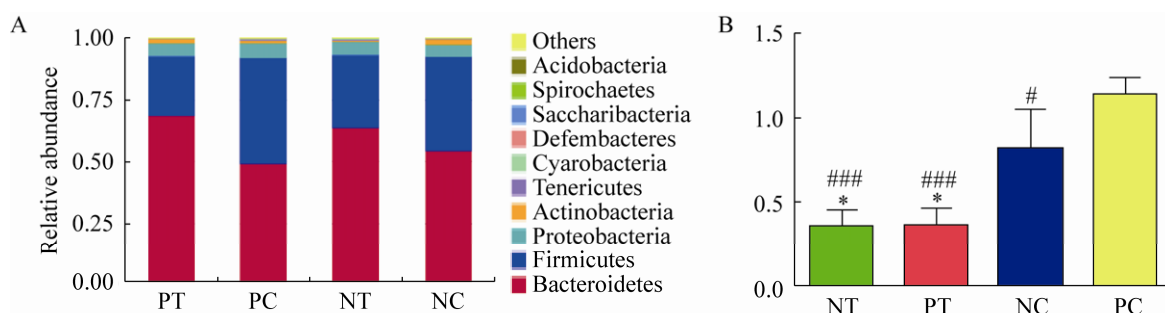


图 6 门类群落结构组成分布图 (A: 门水平前 10 种细菌的相对丰度; B: Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) 在不同组中的比值情况。\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$  vs NC; #:  $P<0.05$ ; ##:  $P<0.01$ ; ###:  $P<0.001$  vs PC)  
Fig. 6 Distribution structure of community structure. (A) Relative abundance of the top 10 bacterial at the level of phylum. (B) The ratio of Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) in different groups (\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$  vs NC; #:  $P<0.05$ ; ##:  $P<0.01$ ; ###:  $P<0.001$  vs PC).



SL001 会增加其相对丰度,与图 6 结果相一致。AD 模型小鼠中的乳酸杆菌目 (Lactobacillales)、芽胞杆菌目 (Bacillales) 和双歧杆菌目 (Bifidobacteriales) 的相对丰度均低于野生型,添食 *L. reuteri* SL001 会增加这 3 个目在 AD 模型小鼠中的相对丰度,但在野生型中则是降低的效果。AD 模型小鼠中的丹毒丝菌目 (Erysipelotrichales) 相对丰度高于野生型,添食 *L. reuteri* SL001 会降低其在两种小鼠中的相对丰度。

### 2.3.4 细菌属分类水平的比较

从图 8 可以看出,在属水平上,4 组小鼠的 *Allobaculum*、毛螺旋菌属 (*Lachnospiraceae*\_NK4A136\_group)、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和

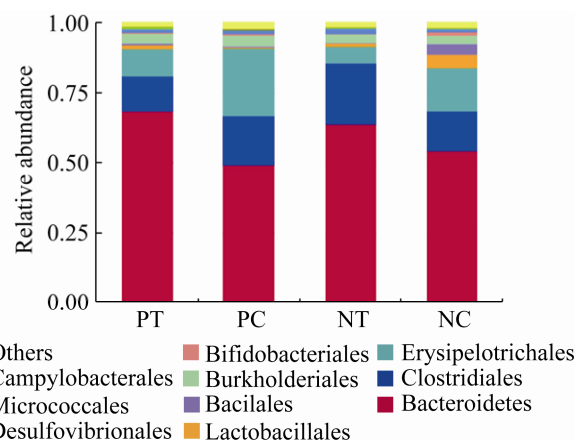


图 7 目水平上前 10 种细菌的相对丰度

Fig. 7 Relative abundance of the top 10 bacterial at the level of order.

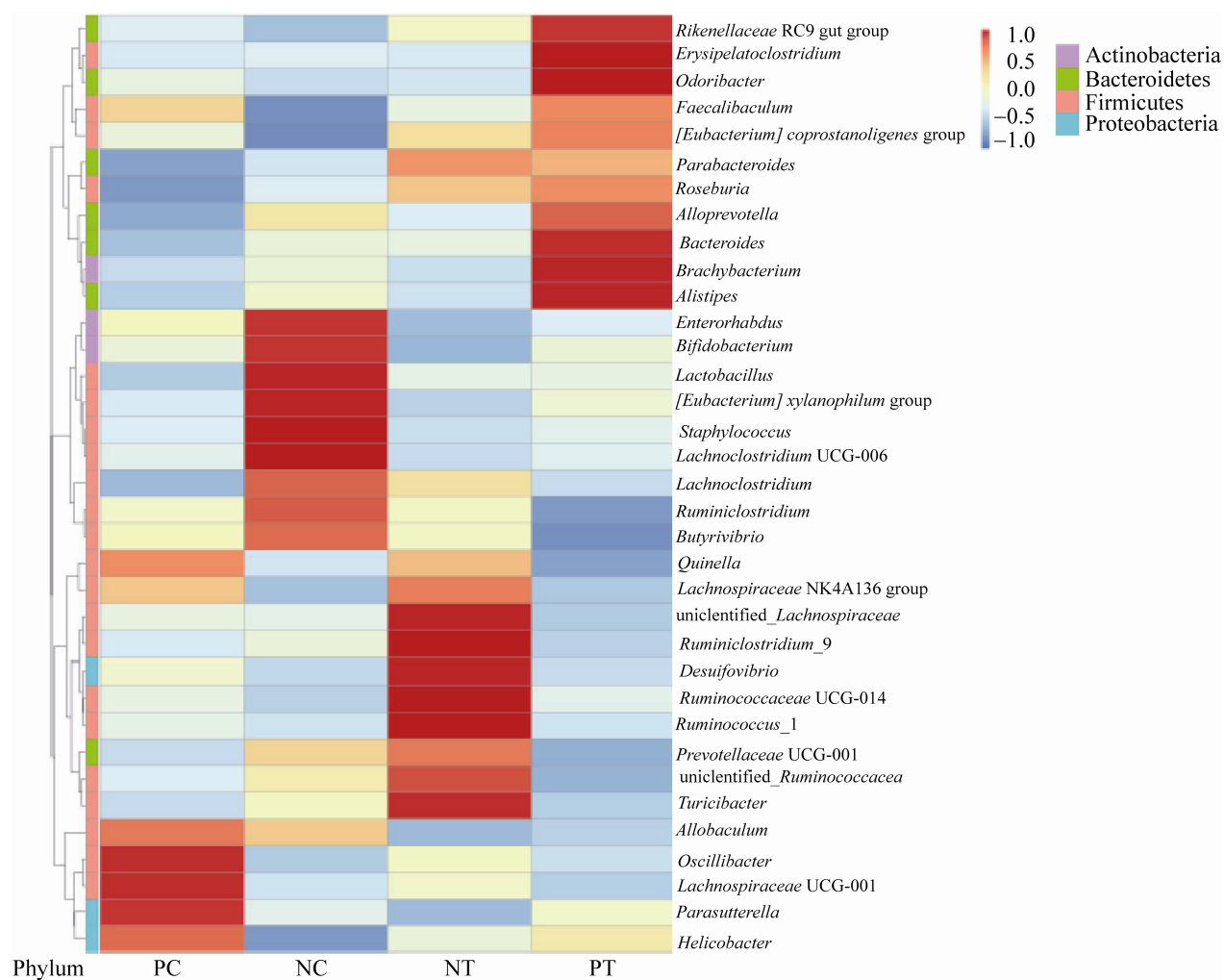


图 8 含系统发育进化树的热图(属水平)

Fig. 8 Heatmap graph with phylogenetic tree (genus level).

乳酸菌属 (*Lactobacillus*) 所占比例较大, 相对丰度高。AD 模型小鼠的拟杆菌属、乳酸菌属、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 和拟普雷沃菌属 (*Alloprevotella*) 的相对丰度低于野生型小鼠, 添食 *L. reuteri* SL001 会增加这些属在 AD 模型小鼠中的丰度, 降低在野生型小鼠中的丰度。AD 模型小鼠的丁酸弧菌属 (*Butyrivibrio*) 相对丰度也低于野生型, 但是添食 *L. reuteri* SL001 后, 其相对丰度在两种小鼠中均出现降低。

## 2.4 肠道菌群 LefSe 分析

通过对 PC 组和 NC 组进行 LefSe 分析可知 (图 9A–B), 野生型小鼠的优势菌种为杆菌纲 (Bacilli) 中的乳酸杆菌科 (Lactobacillaceae), 在 AD 模型小鼠中未发现优势菌群。在 PT 组和 NT 组的比较中 (图 9C), 均未发现丰度差异显著的菌种, 表明添食 *L. reuteri* SL001 可减小 AD 模型小鼠与野生型小鼠之间的差异。

## 2.5 物种分类树分析

由 4 个处理组不同比例的物种分类树 (图 10) 可以看出, 野生型小鼠在杆菌纲 (Bacilli) 以及乳酸杆菌目、芽孢杆菌目、乳酸杆菌科中的比例占有绝对优势, AD 模型小鼠占有比例较小。添食 *L. reuteri* SL001 后, AD 模型小鼠在以上菌群中的占有比例增加。

## 3 讨论

在本研究中, 我们调查了 AD 模型小鼠 (APP/PS1 双转基因小鼠) 和野生型小鼠 (C57BL/6) 之间的肠道菌群差异, 分析了 *L. reuteri* SL001 对两种小鼠肠道微生物菌群结构的影响。 $\alpha$  多样性分析的结果表明, AD 模型小鼠的  $\alpha$  多样性大于野生型小鼠, 但是两者之间的差异较小。添食 *L. reuteri* SL001 后, 两种小鼠的  $\alpha$  多样性均增加, 并且 AD 模型小鼠的增幅较小。这可能是因为 AD 模型小鼠自身独有的某些微生物, 会对外来微生物的生长产

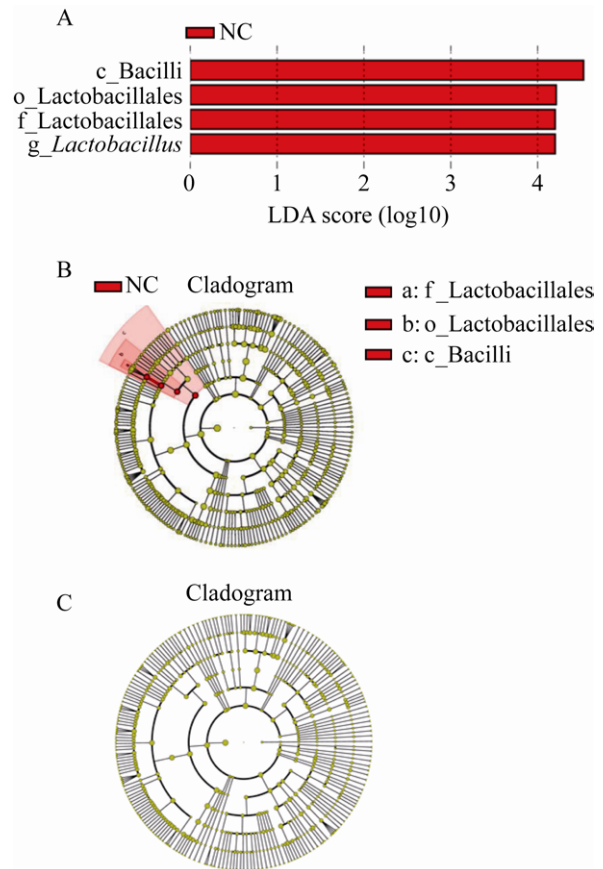


图 9 LefSe 分析 (A: PC 组与 NC 组间 LDA 值分布柱状图; B: PC 组与 NC 组间进化树分支图; C: PT 组与 NT 组间进化树分支图)

Fig. 9 LefSe analysis. (A) Histogram of LDA value distribution between PC group and NC group. (B) Phylogenetic tree branch diagram between PC group and NC group. (C) Phylogenetic tree branch diagram between PT group and NT group.

生抑制作用, 也可能是因为某些微生物的代谢产物改变了小鼠肠道环境, 使部分微生物更加不易定殖繁殖, 这也说明 AD 模型小鼠的肠道菌群不易调节, 而这也成为一些治疗手段的阻碍因素。 $\beta$  多样性分析结果显示, AD 模型小鼠和野生型小鼠没有出现明显的组内聚集, 组内差异大, 但是添食 *L. reuteri* SL001 后均表现出较明显的组内聚集, 说明 *L. reuteri* SL001 可以在一定程度上减少组内个体间的差异, 使同种小鼠的肠道微生物更趋于一致, 保持更稳定的状态。



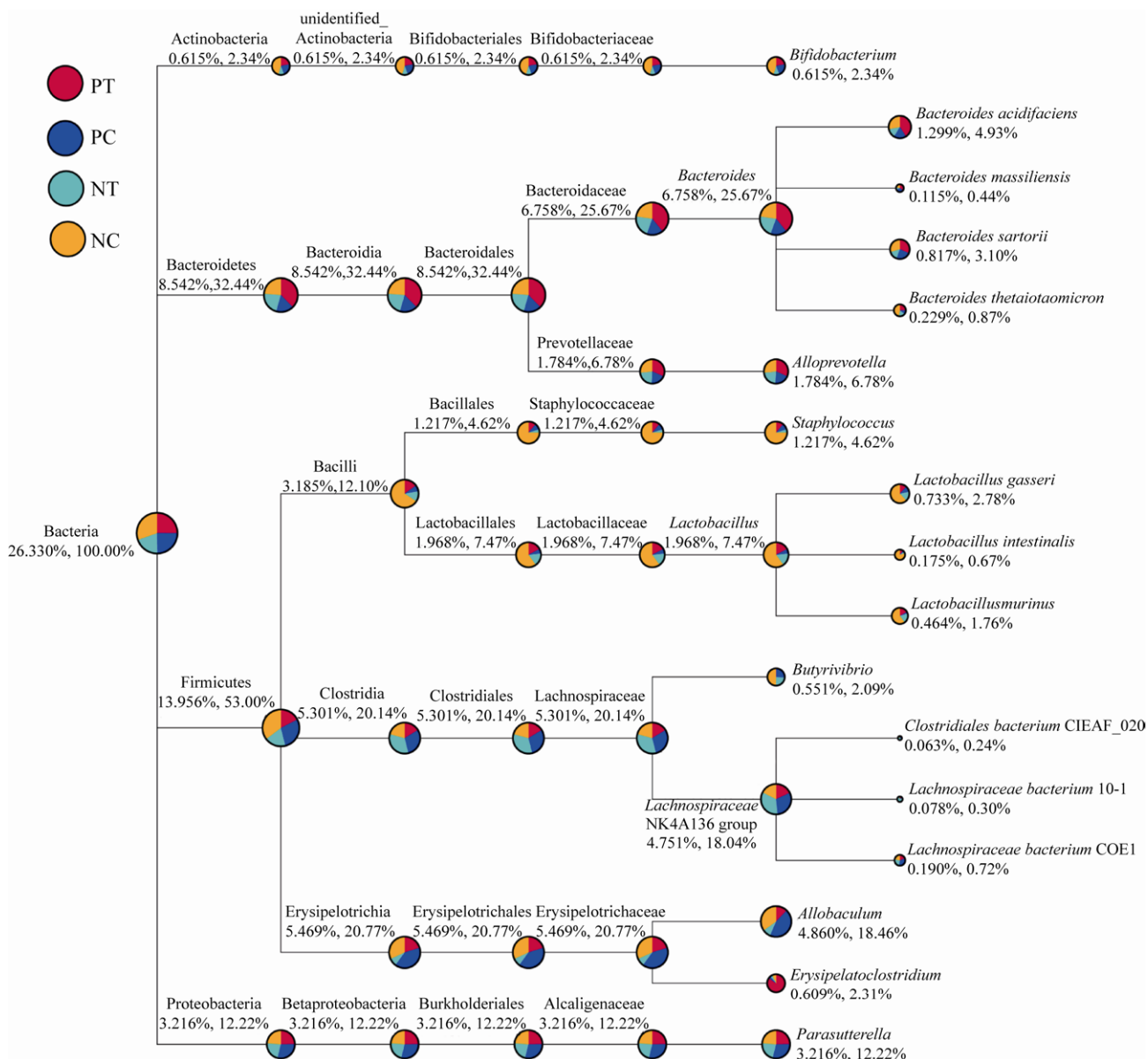


图 10 小鼠肠道微生物物种分类树

Fig. 10 Species classification tree of intestinal microorganisms in mice.

在我们的测序数据中,所有样品的优势菌门都为拟杆菌门和厚壁菌门,两种菌门约占序列总数 92%。厚壁菌门和拟杆菌门与体重有着密切联系<sup>[21]</sup>,而且厚壁菌门与拟杆菌门的比值(F/B)增加可能会导致过多的免疫反应和过量饮食,促进能量在体内的富集,造成肥胖<sup>[22-23]</sup>,所以 F/B 的比值也是肥胖和 2 型糖尿病(T2DM)的明显标志<sup>[24]</sup>。有趣的是,阿尔兹海默症被称作为 3 型糖尿病<sup>[25]</sup>,

并且其他研究也表明,相对于野生型,AD 模型小鼠的 F/B 比值增加<sup>[12]</sup>。因此,F/B 的比值增加可能指示着患 AD 风险也在增加<sup>[26]</sup>。由图 5B 可以看出,AD 模型小鼠中的拟杆菌门丰度低于野生型,厚壁菌门的丰度高于野生型,添食 *L. reuteri* SL001 会造成两种小鼠的 F/B 比值下降,而且 AD 添食组与 AD 未喂食组存在显著性差异,表明 *L. reuteri* SL001 对 AD 模型小鼠有潜在的有益作用。

在目水平上, AD 模型小鼠中的拟杆菌目、乳酸杆菌目、芽胞杆菌目和双歧杆菌目的相对丰度均低于野生型, 添食 *L. reuteri* SL001 可增加这 4 种目在 AD 模型小鼠中的相对丰度。拟杆菌、乳酸杆菌和双歧杆菌可以产生短链脂肪酸 (Short-chain fatty acid, SCFAs), 包括乙酸盐、丁酸盐和丙酸盐。研究表明乙酸盐可以增强全身葡萄糖稳态, 也能穿过血脑屏障, 向大脑发出饱足感<sup>[26]</sup>。丁酸盐是一种多功能分子, 可以保护神经, 恢复血脑屏障的功能, 具有明显的认知和抗抑郁作用<sup>[27]</sup>。在 AD 模型中, 丁酸钠的使用可显著改善小鼠的学习记忆能力<sup>[28-29]</sup>。丙酸盐能影响小胶质细胞的活化并降低血脑屏障的渗透性, 也可防止不适当的免疫反应<sup>[30-31]</sup>。综上所述, SCFAs 水平的降低可能与 AD 的发展密切相关。添食 *L. reuteri* SL001 可增加产生 SCFAs 的细菌, 所以 *L. reuteri* SL001 可能对 AD 的发展具有缓解抑制作用。在 AD 患者的额叶、颞叶和顶叶皮质均发现 GABA 水平降低, 而肠道中的某些双歧杆菌和乳杆菌可能将谷氨酸盐转化为 GABA, 调节机体的认知行为<sup>[17]</sup>。另外, 服用某些乳酸杆菌和双歧杆菌可以恢复 AD 模型小鼠海马中神经营养因子的水平, 抑制 A $\beta$  斑块的产生并改善学习记忆能力<sup>[32-33]</sup>。芽胞杆菌具有产生乙酰胆碱的能力, 而乙酰胆碱是 AD 患者大脑中减少的一种神经递质, 所以芽胞杆菌可能会通过迷走神经帮助胆碱信号的传递<sup>[34-36]</sup>。我们的研究表明, *L. reuteri* SL001 可以增强以上细菌在 AD 模型小鼠中的相对丰度, 这可能会降低脑部的免疫反应、A $\beta$  斑块的沉积和小胶质细胞的过度活化, 进而改善学习记忆能力。*L. reuteri* SL001 是否会通过以上途径缓解 AD 病症还需要进一步的实验研究。

在属水平上, AD 模型小鼠的拟普雷沃菌属和丁酸弧菌属相对丰度均低于野生型小鼠, 添食 *L. reuteri* SL001 会增加拟普雷沃菌属在 AD 模型小鼠中的丰度, 降低丁酸弧菌属的丰度。拟普雷沃菌

属也可以产生短链脂肪酸, 发挥对生物体有益的作用。丁酸弧菌属可以产生内毒素, 内毒素能够引起炎症反应、损害肠屏障、引起人体代谢与免疫失调, 从而诱导肥胖、胰岛素抵抗、糖尿病等代谢性疾病<sup>[37-38]</sup>。当机体衰老时, 胃肠粘膜和血脑屏障的渗透性增加, 内毒素更容易到达大脑, 诱发神经炎症和 A $\beta$  增加, 进而引起 AD 疾病的发展<sup>[39-40]</sup>。有研究表明 AD 患者血浆中的内毒素含量远远高于正常人<sup>[41]</sup>, 所以减少内毒素的产生可能会对 AD 的治疗起到积极作用。添食 *L. reuteri* SL001 增加了对改善病症有益的细菌, 减少了加剧 AD 病理的细菌, 表明 *L. reuteri* SL001 可以调节 AD 模型小鼠的肠道微生物结构, 可能对生物体的生理功能产生积极影响。

通过 LEfSe 分析可知, 野生型小鼠的优势菌种为杆菌纲中的乳酸杆菌科和乳酸杆菌属, 在 AD 模型小鼠中未发现优势菌群, 这一结果也与物种分类树结果相符。在添食 *L. reuteri* SL001 后, 在两种小鼠中均未发现丰度差异显著的菌种, 说明 *L. reuteri* SL001 干预可以改善 AD 模型小鼠的肠道微生物结构, 使其更接近野生型小鼠。有其他研究报告 AD 模型小鼠肠道中丰度差异显著的菌种为中紫单胞菌科的帕拉普氏菌 (*Paraprevotellaceae*) 和普氏菌属 (*Prevotella*)<sup>[42]</sup>, 与我们本次实验结果不一致, 这有可能是因为选择的 AD 模型小鼠以及鼠龄不同等多方面原因所导致。我们的结果可以丰富 AD 模型小鼠的肠道微生物研究, 并具有一定的参考价值。若益生菌干预能够重塑肠道平衡, 减少患 AD 的风险, 可为以后的 AD 治疗提供一种安全可靠的策略。

## REFERENCES

- [1] Selkoe DJ. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein. *J Alzheim Dis*, 2001, 3(1): 75-80.
- [2] Faller P, Hureau C. A bioinorganic view of Alzheimer's disease: when misplaced metal ions

- (re)direct the electrons to the wrong target. *Chem: A Eur J*, 2012, 18(50): 15910–15920.
- [3] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 2010, 362(4): 329–344.
- [4] McNaull BBA, Todd S, McGuinness B, et al. Inflammation and anti-inflammatory strategies for Alzheimer's disease—a mini-review. *Gerontology*, 2010, 56(1): 3–14.
- [5] Nisbet RM, Polanco JC, Ittner LM, et al. Tau aggregation and its interplay with amyloid- $\beta$ . *Acta Neuropathol*, 2015, 129(2): 207–220.
- [6] Zhang L, Wang Y, Xia XY, et al. Altered gut microbiota in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*, 2017, 60(4): 1241–1257.
- [7] Harach T, Marungruang N, Duthilleul N, et al. Erratum: Reduction of A $\beta$  amyloid pathology in APPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci Rep*, 2017, 7: 46856.
- [8] Wu SC, Cao ZS, Chang KM, et al. Intestinal microbial dysbiosis aggravates the progression of Alzheimer's disease in *Drosophila*. *Nat Commun*, 2017, 8: 24.
- [9] Harach T, Marungruang N, Duthilleul N, et al. Reduction of A $\beta$  amyloid pathology in APPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci Rep*, 2017, 7: 41802.
- [10] Minter MR, Zhang C, Leone V, et al. Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 2016, 6: 30028.
- [11] Kountouras J, Boziki M, Zavos C, et al. A potential impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease pathobiology and course. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(7): e3–e4.
- [12] Wang XY, Sun GQ, Feng T, et al. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression. *Cell Res*, 2019, 29(10): 787–803.
- [13] Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 2012, 336(6086): 1262–1267.
- [14] Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 2012, 489(7415): 242–249.
- [15] Wang Y, Kasper LH. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behav Immun*, 2014, 38: 1–12.
- [16] Giau VV, Wu SY, Jamerlan A, et al. Gut microbiota and their neuroinflammatory implications in Alzheimer's disease. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1765.
- [17] Girolamo F, Coppola C, Ribatti D. Immunoregulatory effect of mast cells influenced by microbes in neurodegenerative diseases. *Brain Behav Immun*, 2017, 65: 68–89.
- [18] He BK, Hoang TK, Wang T, et al. Resetting microbiota by *Lactobacillus reuteri* inhibits T reg deficiency-induced autoimmunity via adenosine A $_2A$  receptors. *J Exp Med*, 2017, 214(1): 107–123.
- [19] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 Suppl 1(S1): 4516–4522.
- [20] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3): 695–700.
- [21] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027–1031.
- [22] Cani PD, Osto M, Geurts L, et al. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microb*, 2012, 3(4): 279–288.
- [23] Harris KA, Kassis A, Major G, et al. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders. *J Obes*, 2012: 879151.
- [24] Serino M, Luche E, Gres S, et al. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut*, 2012, 61(4): 543–553.
- [25] de la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes—evidence reviewed. *Jo Diabet Sci Technol*, 2008, 2(6): 1101–1113.
- [26] Du XG, Wang XY, Geng MY. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Trans Neurodegener*,

- 2018, 7: 2.
- [27] Li HX, Sun J, Wang FY, et al. Sodium butyrate exerts neuroprotective effects by restoring the blood-brain barrier in traumatic brain injury mice. *Brain Res*, 2016, 1642: 70–78.
- [28] Govindarajan N, Agis-Balboa RC, Walter J, et al. Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. *J Alzheimers Dis*, 2011, 26(1): 187–197.
- [29] Kilgore M, Miller CA, Fass DM, et al. Inhibitors of class I histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(4): 870–880.
- [30] Mayer EA, Tillisch K, Gupta A, et al. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest*, 2015, 125(3): 926–938.
- [31] Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun*, 2014, 5: 3611.
- [32] Savignac HM, Tramullas M, Kiely B, et al. Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain. *Behav Brain Res*, 2015, 287: 59–72.
- [33] Liang S, Wang T, Hu X, et al. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience*, 2015, 310: 561–577.
- [34] Kawashima K, Misawa H, Moriwaki Y, et al. Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems. *Life Sci*, 2007, 80(24/25): 2206–2209.
- [35] Partosoedarso ER, Blackshaw LA. Roles of central glutamate, acetylcholine and CGRP receptors in gastrointestinal afferent inputs to vagal preganglionic neurones. *Auton Neurosci: Bas Clin*, 2000, 83(1/2): 37–48.
- [36] Wall R, Cryan JF, Ross RP, et al. Bacterial neuroactive compounds produced by psychobiotics. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 817: 221–239.
- [37] Asti A, Gioglio L. Can a bacterial endotoxin be a key factor in the kinetics of amyloid fibril formation? *J Alzheimers Dis*, 2014, 39(1): 169–179.
- [38] Jaeger LB, Dohgu S, Sultana R, et al. Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid  $\beta$  protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun*, 2009, 23(4): 507–517.
- [39] Hill JM, Lukiw WJ. Microbial-generated amyloids and Alzheimer's disease (AD). *Front Aging Neurosci*, 2015, 7: 9.
- [40] Hammer ND, Wang X, McGuffie BA, et al. Amyloids: friend or foe? *J Alzheimers Dis*, 2008, 13(4): 407–419.
- [41] Giuliani N, Morandi F, Tagliaferri S, et al. Production of Wnt Inhibitors by Myeloma Cells: Potential Effects on Canonical Wnt Pathway in the Bone Microenvironment. *Cancer Res*, 2007, 67(16): 7665–7674.
- [42] Song N. Effect of cyaniding-3-glucoside on glucose and lipid metabolism in the APP<sup>swE</sup>/PS1 <sup>$\Delta$ e9</sup> mouse model of Alzheimer's disease[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2016 (in Chinese).  
宋楠. 矢车菊素-3-0-葡萄糖苷对 APP<sup>swE</sup>/PS1 <sup>$\Delta$ e9</sup>转基因阿尔茨海默病模型小鼠神经保护的作用机制及其对肠道菌群的影响[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.

(本文责编 郝丽芳)