

• 论著 •

粪菌移植通过肠道菌群调节脓毒症大鼠脑皮质胆碱能抗炎通路

李素彦¹ 许宁² 花然亮² 牛小莉³ 吕畅² 李明泉² 李建国¹

¹ 河北省人民医院全科医疗科,石家庄 050051; ² 河北省人民医院急诊科,石家庄 050051;

³ 河北省人民医院神经内科,石家庄 050051

通信作者:李素彦,Email:giky114@sina.com

【摘要】目的 探讨粪菌移植对脓毒症大鼠肠道菌群及胆碱能抗炎通路的影响。**方法** 将60只清洁级雄性SD大鼠按随机数字表法分为生理盐水(NS)对照组、脓毒症模型组和粪菌移植组,每组20只。经尾静脉注射脂多糖(LPS)10 mg/kg制备脓毒症大鼠模型;NS对照组同途径给予等量NS。粪菌移植组于制模后1 d将正常大鼠粪便稀释后灌胃,每次2 mL,每日3次;其余两组给予等量NS灌胃。于制模后7 d采集大鼠粪便,采用16SrDNA基因测序技术检测肠道菌群的变化;监测脑电图变化,计算脑电图异常波形的发生率;处死大鼠取脑组织,采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定脑皮质 α 7烟碱型乙酰胆碱受体(α 7nAChR)蛋白表达,采用免疫组化法检测脑皮质离子钙接头分子-1(Iba-1)阳性表达,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定脑皮质白细胞介素(IL-6、IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量。**结果** 制模后7 d,NS对照组大鼠全部存活;脓毒症模型组和粪菌移植组分别死亡10只、8只,死亡率分别为50%、40%。最终,NS对照组n=20,脓毒症模型组n=10,粪菌移植组n=12。与NS对照组比较,模型组大鼠肠道菌群多样性及结构均发生改变,异常脑电图发生率明显升高,脑皮质 α 7nAChR蛋白表达明显下降,Iba-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达明显升高,提示脓毒症大鼠肠道菌群失衡,脑皮质内发生严重的炎症反应,脑功能受损。与模型组比较,粪菌移植组大鼠肠道菌群 α 多样性指数明显升高(物种指数:510.24±58.76比282.50±47.42,Chao1指数:852.75±25.24比705.50±46.50,均P<0.05),由LPS诱导的基于门、科、属水平的肠道菌群结构失衡也得到明显逆转;随着肠道菌群的改善,粪菌移植组大鼠异常脑电波形的发生率较模型组明显降低[25.0%(3/12)比80.0%(8/10),P<0.05],脑皮质 α 7nAChR蛋白表达明显升高(α 7nAChR/ β -actin:1.56±0.05比0.82±0.07,P<0.05),免疫组化显示Iba-1阳性表达的小胶质细胞明显减少,且脑皮质TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量均明显下降[TNF- α (ng/L):6.28±0.61比12.02±0.54,IL-6(ng/L):28.26±3.15比60.58±4.62,IL-1 β (ng/L):33.63±3.48比72.56±2.25,均P<0.05]。**结论** 通过粪菌移植可改善脓毒症大鼠肠道菌群失衡,同时可激活胆碱能抗炎通路,减轻脓毒症相关性脑病。

【关键词】 粪菌移植; 肠道菌群; 脓毒症; 脓毒症相关性脑病; 胆碱能抗炎通路; α 7烟碱型乙酰胆碱受体; 神经炎症反应; 小胶质细胞

基金项目: 河北省科技计划项目(17277720D);河北省医学科学研究重点课题计划项目(20170262);河北省中医药类科研计划项目(2017060)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.09.009

Fecal microbiota transplantation regulates the cholinergic anti-inflammatory pathway in cerebral cortex of septic rats through intestinal microbiota

Li Suyan¹, Xu Ning², Hua Ranliang², Niu Xiaoli³, Lyu Chang², Li Mingquan², Li Jianguo¹

¹ Department of General Medicine, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China; ² Department of Emergency, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China; ³ Department of Neurology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China

Correspondent author: Li Suyan, Email: giky114@sina.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of fecal microbiota transplantation on septic gut flora and the cortex cholinergic anti-inflammatory pathway in rats. **Methods** Sixty clean grade male Sprague-Dawley (SD) rats were divided into normal saline (NS) control group, sepsis model group and fecal microbiota transplantation group by random number table, with 20 rats in each group. The rat model of sepsis was reproduced by injection of 10 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) via tail vein, the rats in the NS control group was given the same amount of NS. The rats in the fecal microbiota transplantation group received nasogastric infusion of feces from healthy donor on the 1st day, 2 mL each time, for 3 times a day, the other two groups were given equal dose of NS by gavage. Fecal samples were collected on the 7th day after modeling, the levels of intestinal microbiota composition was determined using the 16SrDNA gene sequencing technology. The brain function was evaluated by electroencephalogram (EEG), and the proportion of each waveform in EEG was calculated. After sacrifice of rats, the brain tissues were harvested, the levels of protein expression of α 7 nicotinic acetylcholine receptor (α 7nAChR) were determined by Western Blot, and positive cells of Iba-1 in brain tissue were detected by immunohistochemistry method. The levels of interleukins (IL-6 and IL-1 β) and tumor necrosis

factor- α (TNF- α) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Seven days after the reproduction of the model, all rats in the NS control group survived, while 10 rats and 8 rats died in the sepsis model group and fecal microbiota transplantation group, respectively, with mortality rates of 50% and 40% respectively. Finally, there were 20 rats in the NS control group, 10 in the sepsis model group and 12 in the fecal microbiota transplantation group. Compared with the NS control group, the diversity and composition of intestinal flora were changed, the incidence of abnormal EEG increased significantly, the expression of α 7nAChR in the cortex decreased significantly, and the levels of Iba-1, TNF- α , IL-6 and IL-1 β were significantly increased in the model group, suggested that the intestinal flora was dysbiosis, and severe inflammatory reaction occurred in the cerebral cortex, and brain function was impaired. Compared with the model group, the diversity of intestinal flora in the fecal microbiota transplantation group was significantly increased (species index: 510.24 ± 58.76 vs. 282.50 ± 47.42 , Chao1 index: 852.75 ± 25.24 vs. 705.50 ± 46.50 , both $P < 0.05$), the dysbiosis of intestinal flora at phylum, family, genus level induced by LPS were also significantly reversed, and with the improvement of intestinal flora, the incidence of abnormal EEG waveforms was lower in the fecal microbiota transplantation group compared with that in the model group [25.0% (3/12) vs. 80.0% (8/10), $P < 0.05$], and the expression of α 7nAChR protein in the cerebral cortex was significantly increased (α 7nAChR/ β -actin: 1.56 ± 0.05 vs. 0.82 ± 0.07 , $P < 0.05$), immunohistochemistry analysis showed that Iba-1 positive expression of microglia decreased significantly, and cerebral cortex TNF- α , IL-6, IL-1 β levels were significantly decreased [TNF- α (ng/L): 6.28 ± 0.61 vs. 12.02 ± 0.54 , IL-6 (ng/L): 28.26 ± 3.15 vs. 60.58 ± 4.62 , IL-1 β (ng/L): 33.63 ± 3.48 vs. 72.56 ± 2.25 , all $P < 0.05$]. **Conclusion** The results reveal that fecal microbiota transplantation has remarkably modulated the dysbiosis of intestinal microbiota and activated cholinergic anti-inflammatory pathway, and ameliorate the brain dysfunction in septic rats.

【Key words】 Fecal microbiota transplantation; Intestinal microbiota; Sepsis; Sepsis associated encephalopathy; Cholinergic anti-inflammatory pathway; α 7 nicotinic acetylcholine receptor; Neuroinflammation; Microglia

Fund program: Hebei Provincial Science and Technology Planning Project of China (17277720D); Hebei Provincial Health and Family Planning Commission Program of China (20170262); Hebei Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine Program of China (2017060)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.09.009

脓毒症发病率为 437/(10 万·年), 约 70% 合并脑功能损伤, 称为脓毒症相关性脑病(SAE), 目前对 SAE 缺乏特异性治疗手段^[1]。本课题组前期研究表明, 脓毒症患者早期可发生肠道菌群改变, 通过迷走神经影响 SAE 的病情严重程度^[2-3]。因此, 纠正肠道菌群紊乱可能是治疗 SAE 的有效方法。目前通过粪菌移植纠正各种疾病状态的肠道菌群失衡越来越受到重视, 研究证实粪菌移植可以减轻多器官功能障碍综合征(MODS)患者的器官损伤程度^[4]。研究表明, 肠道菌群移植是纠正复发性难辨梭状芽孢杆菌感染患者菌群失调和恢复正常肠道微生物群的有效方法^[5]。但目前关于粪菌移植对脓毒症早期肠道菌群失衡和脑功能的影响及机制研究较少。

中枢神经系统炎症反应失衡是 SAE 发生发展的主要机制, 胆碱能抗炎通路可调节炎症反应, 也是肠道菌群调节脑功能的主要通路之一。研究表明, 胆碱能抗炎通路能调节脓毒症的炎症程度, 高水平迷走神经活性与低水平全身炎性细胞因子相关^[6]。研究表明, 刺激迷走神经能减少脂多糖(LPS)诱导的大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)释放^[7]。粪菌移植是否通过纠正肠道菌群失衡进而影响脓毒症大鼠脑皮质内胆碱能抗炎通路, 目前研究较少。本实验旨在探讨粪菌移植对脑皮质内胆碱能抗炎通路的影响及机制, 为 SAE 的治疗提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组: 60 只清洁级雄性 SD 大鼠, 体重 200~250 g, 由河北医科大学动物实验中心提供, 动物许可证号: SYXK(冀)2015-0065。适应性饲养 1 周后按随机数字表法分为生理盐水(NS)对照组、脓毒症模型组、粪菌移植组, 每组 20 只。

1.2 模型制备及处理: 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 经尾静脉注射 LPS(O55:B5, 美国 Sigma 公司) 10 mg/kg 制备脓毒症大鼠模型; NS 对照组给予等量 NS。粪菌移植组于制模后 1 d 将正常大鼠粪便稀释分离后取上清液 2 mL 灌胃, 每日 3 次; 另两组灌胃等量 NS。本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准, 经河北省人民医院伦理委员会审批(审批号: 2014-0387)。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 肠道菌群特点分析: 制模后 7 d 收集各组大鼠新鲜粪便约 1 g, 置于 -80 °C 冰箱保存待测。采用 16SrDNA 高通量基因测序技术分析肠道菌群特点。

1.3.2 脑电图记录: NS 对照组直接描记大鼠清醒状态下皮质脑电图; 其余两组大鼠于制模后 7 d 描记清醒状态下皮质脑电图, 采样时间 10 min, 选取最后 20 s 波形进行分析。

1.3.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot) 检测脑皮质 α 7 烟碱型乙酰胆碱受体(α 7nAChR)的蛋白

表达:制模后7 d处死大鼠取脑组织,剥离大脑皮质,经溶解、离心、电泳、显影等步骤后,用Image J软件分析,以目的条带与内参条带 β -肌动蛋白(β -actin)吸光度(A)值比值作为目的蛋白表达量。

1.3.4 免疫组化法检测脑皮质离子钙接头分子-1(Iba-1)蛋白表达:取大鼠脑皮质,固定、脱水、包埋,4 μm切片,用免疫组化法测定各组大鼠脑皮质组织Iba-1蛋白含量,以反映小胶质细胞的激活情况。应用全能显微镜观察脑皮质Iba-1阳性细胞,Iba-1阳性的小胶质细胞体积小,以细胞质棕黄色染色为主,细胞形态主要呈“分支状”。

1.3.5 酶联免疫吸附试验(ELISA)测定脑皮质炎性因子水平:制模7 d后处死大鼠取脑皮质,NS清洗后制成匀浆,离心后取上清液,采用ELISA法检测白细胞介素(IL-6、IL-1 β)和TNF- α 水平,具体步骤按试剂盒说明书进行。

1.4 统计学分析:使用SPSS 17.0统计软件处理数据。符合正态分布的计量资料均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用t检验;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物一般情况:制模后7 d,NS对照组大鼠全部存活;模型组和粪菌移植组分别死亡10只、8只,死亡率分别为50%、40%。

2.2 肠道菌群分析

2.2.1 各组大鼠肠道菌群 α 多样性指数比较(图1):与NS对照组比较,模型组大鼠肠道菌群 α 多样性指数(物种指数、Chao1指数)明显降低(均 $P < 0.05$);与模型组比较,粪菌移植组大鼠上述肠道菌群 α 多样性指数均明显升高(均 $P < 0.05$)。

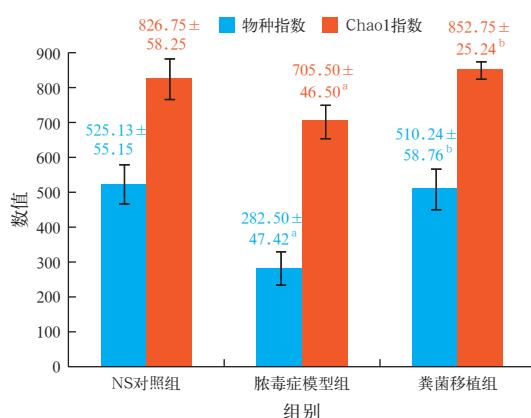
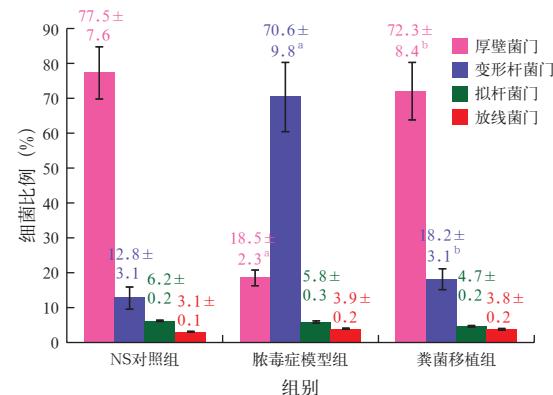


图1 各组大鼠肠道菌群 α 多样性指数的比较

2.2.2 各组大鼠肠道菌群门水平比较(图2):与NS对照组比较,模型组大鼠肠道菌群中厚壁菌门比例显著降低,变形杆菌门比例明显升高(均 $P < 0.05$);与模型组比较,粪菌移植组厚壁菌门比例显著升高,变形杆菌门比例明显降低(均 $P < 0.05$)。3组大鼠肠道菌群中拟杆菌门、放线菌门比例比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。



注:与生理盐水(NS)对照组比较,^a $P < 0.05$;
与脓毒症模型组比较,^b $P < 0.05$

图2 各组大鼠肠道菌群门水平的比较

2.2.3 各组大鼠肠道菌群科水平比较(表1):与NS对照组比较,模型组大鼠肠道菌群中氨基酸球菌科、梭杆菌科、理研菌科比例均显著升高,拟杆菌科、瘤胃菌科、双歧杆菌科比例均显著降低(均 $P < 0.05$);与模型组比较,粪菌移植组氨基酸球菌科、梭杆菌科、理研菌科比例均显著降低,拟杆菌科、瘤胃菌科、双歧杆菌科比例均显著升高(均 $P < 0.05$)。

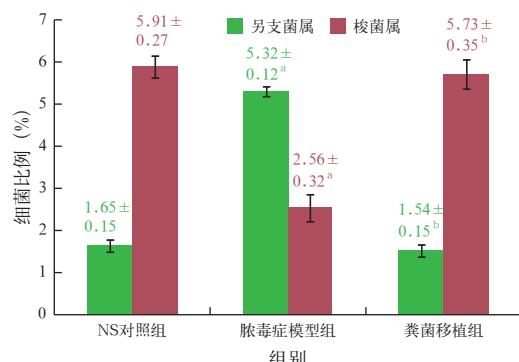
表1 各组大鼠肠道菌群科水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	细菌比例(%)		
		氨基酸球菌科	梭杆菌科	理研菌科
NS对照组	20	1.21 ± 0.11	2.29 ± 0.21	3.82 ± 0.15
脓毒症模型组	10	13.21 ± 0.92 ^a	12.98 ± 0.95 ^a	17.92 ± 0.21 ^a
粪菌移植组	12	1.32 ± 0.21 ^b	2.31 ± 1.21 ^b	3.59 ± 0.32 ^b

组别	动物数 (只)	细菌比例(%)		
		拟杆菌科	瘤胃菌科	双歧杆菌科
NS对照组	20	8.21 ± 0.89	6.72 ± 1.45	7.21 ± 1.65
脓毒症模型组	10	2.21 ± 0.21 ^a	1.50 ± 0.43 ^a	1.71 ± 0.21 ^a
粪菌移植组	12	7.89 ± 1.01 ^b	6.54 ± 0.39 ^b	7.12 ± 0.65 ^b

注:与生理盐水(NS)对照组比较,^a $P < 0.05$;与脓毒症模型组比较,^b $P < 0.05$

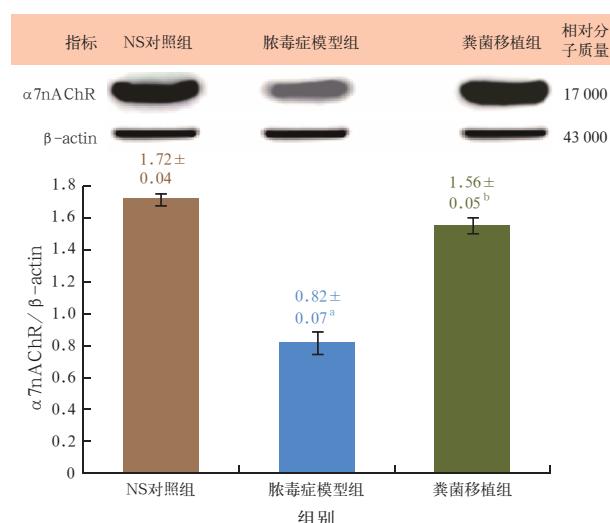
2.2.4 各组大鼠肠道菌群属水平比较(图3):与NS对照组比较,模型组大鼠肠道菌群中另支菌属比例显著升高,梭菌属比例明显降低(均 $P < 0.05$);与模型组比较,粪菌移植组大鼠另枝菌属比例明显降低,梭菌属比例明显升高(均 $P < 0.05$)。



注:与生理盐水(NS)对照组比较,^a $P<0.05$;
与脓毒症模型组比较,^b $P<0.05$

图3 各组大鼠肠道菌群属水平的比较

2.3 各组大鼠脑皮质 α 7nAChR蛋白表达比较(图4):模型组大鼠脑皮质 α 7nAChR蛋白表达水平明显低于NS对照组($P<0.05$)；与模型组比较，粪菌移植组 α 7nAChR蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。



α 7nAChR为 α 7烟碱型乙酰胆碱受体， β -actin为 β -肌动蛋白；
与生理盐水(NS)对照组比较,^a $P<0.05$ ；
与脓毒症模型组比较,^b $P<0.05$

图4 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠脑皮质 α 7nAChR蛋白表达比较

2.4 各组大鼠脑皮质Iba-1表达比较(表2;图5):NS对照组大鼠脑皮质无明显Iba-1阳性表达；模型组Iba-1阳性表达明显增加；粪菌移植组脑皮质Iba-1阳性表达较模型组明显减少。

表2 各组大鼠脑皮质Iba-1阳性表达比较

组别	动物数 (只)	Iba-1 表达分布[只(%)]	
		阳性	阴性
NS对照组	20	0(0)	20(100.0)
脓毒症模型组	10	10(100.0) ^a	0(0)
粪菌移植组	12	4(33.3) ^b	8(66.7) ^a

注:Iba-1为离子钙接头分子-1；与生理盐水(NS)对照组比较,
^a $P<0.05$ ；与脓毒症模型组比较,^b $P<0.05$

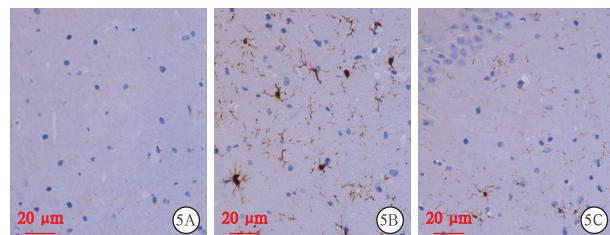
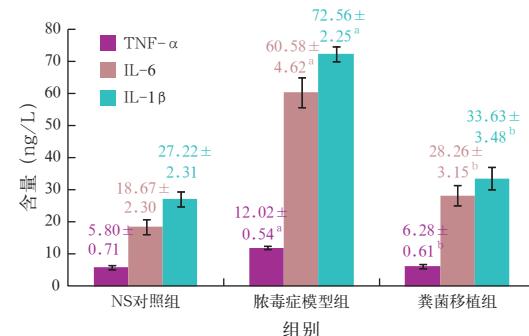


图5 光镜下观察各组大鼠脑皮质离子钙接头分子-1(Iba-1)的阳性表达 棕黄色染色即为Iba-1阳性小胶质细胞。生理盐水(NS)对照组(A)脑皮质无Iba-1阳性小胶质细胞；脓毒症模型组(B)脑皮质可见Iba-1阳性细胞，同时细胞形态各异，突触变粗，胞体增大；粪菌移植组(C)脑皮质阳性小胶质细胞较模型组减少，细胞突出较细，胞体较小 免疫组化染色 中倍放大

2.5 各组大鼠脑皮质炎性因子水平比较(图6):模型组大鼠脑皮质TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量均显著升高(均 $P<0.05$)；粪菌移植组TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量均较模型组显著下降(均 $P<0.05$)。



注:TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-6为白细胞介素-6,
IL-1 β 为白细胞介素-1 β ；与生理盐水(NS)对照组比较,
^a $P<0.05$ ；与脓毒症模型组比较,^b $P<0.05$

图6 各组大鼠脑皮质炎性因子含量比较

2.6 各组大鼠脑电图异常波形比较(表3):与NS对照组比较，模型组大鼠脑电图异常波形发生率均显著升高(均 $P<0.05$)；与模型组比较，粪菌移植组脑电图异常波形发生率均显著降低(均 $P<0.05$)。

表3 各组大鼠脑电图不同异常波形发生率的比较

组别	动物数 (只)	异常波形分布[只(%)]						脑电异常总发生率 [% (只)]
		δ 优势波	θ 优势波	低电压	抑制或爆发抑制	癫痫样放电	三相波	
NS对照组	20	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
脓毒症模型组	10	5(50.0) ^a	6(60.0) ^a	8(80.0) ^a	6(60.0) ^a	6(60.0) ^a	2(20.0) ^a	3(30.0) ^a
粪菌移植组	12	2(16.7) ^b	1(8.3) ^b	1(8.3) ^b	2(16.7) ^b	0(0) ^b	1(8.3) ^b	0(0) ^b

注:与生理盐水(NS)对照组比较,^a $P<0.05$ ；与脓毒症模型组比较,^b $P<0.05$

3 讨 论

SAE 是炎症反应失衡导致的弥散性脑功能障碍,可增加脓毒症患者的病死率,存活患者在出院后仍可存在认知功能障碍,给家庭和社会造成负担。研究表明,胆碱能抗炎通路可通过下调中枢神经系统炎性介质的表达,对脑功能起到保护作用,减轻 SAE 的病情严重程度,为 SAE 提供了潜在的治疗干预靶点^[8]。

本研究显示,与 NS 对照组比较,脓毒症模型组大鼠肠道菌群多样性及结构发生改变,异常脑电图发生率明显升高,脑皮质内 α 7nAchR 表达明显下降,Iba-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达明显升高,提示脓毒症大鼠脑皮质内炎症反应严重失衡,脑功能受损。

脓毒症发生时,患者机体内免疫细胞被激活并释放炎性细胞因子以清除病原微生物,同时迷走神经系统胆碱能抗炎通路被激活,释放乙酰胆碱(ACh)与免疫细胞(如小胶质细胞)表面 α 7nAchR 结合,抑制炎性细胞因子的合成和释放,防止局部和全身炎症反应过度引起组织损伤及器官功能障碍,是胆碱能抗炎通路发挥抗炎作用的具体机制^[9-10]。 α 7nAChR 是胆碱能抗炎通路的主要组成部分,在中枢神经系统,尤其是脑皮质的小胶质细胞等免疫细胞高表达,具有抑制炎症反应的作用。提高中枢神经系统内 α 7nAChR 表达可减轻脓毒症、糖尿病、神经退行性病变的炎症反应^[11-12]。Kong 等^[12]研究发现,应用 α 7nAChR 激动剂可降低心肌内核转录因子- κ B(NF- κ B)、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量,减轻 LPS 诱导的脓毒症心肌损伤;而阻断 α 7nAChR 激动剂的作用后,心肌内 NF- κ B、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量显著增加。激活胆碱能抗炎通路,可以下调小胶质细胞活性,抑制促炎细胞因子的释放,减轻神经炎症反应^[13]。Iba-1 是小胶质细胞特异性的钙结合蛋白,是小胶质细胞激活的标志^[14]。本研究中,通过检测脑皮质中 α 7nAChR、Iba-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达,我们发现脓毒症模型组大鼠脑皮质中 α 7nAchR 蛋白表达明显降低,Iba-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达显著增加;通过粪菌移植,脓毒症大鼠脑皮质中 α 7nAChR 蛋白表达显著增加,Iba-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达显著降低。

粪菌移植可以减轻病理状态下的肠道菌群失衡。研究表明,粪菌移植可提高复发性难辨梭状芽孢杆菌感染患者的肠道菌群多样性,在属水平降低另支菌属的含量,改善患者腹泻等症状,缩短病程^[15]。

McIntosh 等^[16]研究发现,粪菌移植可上调行皮肤移植小鼠厚壁菌门的含量,降低肠道中另支菌属的含量,促进皮肤移植物的存活。Wrzosek 等^[17]研究发现,将健康人的粪便每周 1 次移植给经过聚乙二醇清洁肠道后的小鼠,可使梭菌属稳定地定植于肠道。本研究结果表明,通过粪菌移植可以提高肠道菌群的多样性,在门、科、属水平改善脓毒症大鼠肠道菌群的结构,尤其在属水平可以恢复另支菌属及梭菌属的含量。

肠道菌群失衡与认知功能及脑内的炎症反应密切相关^[18]。Cui 等^[19]研究发现,小鼠长期暴露于噪音环境中,肠道菌群多样性降低,炎症表达增加,可以导致认知功能受损。Berding 和 Donovan^[20]研究发现,饮食摄入蔬菜、豆类、坚果较少的自闭症儿童,体内另支菌属含量增多,梭菌属含量下降,从而加重自闭症的临床症状。患有肌痛性脑脊髓炎/慢性疲劳综合征和肠易激综合征的患者,肠道内另支菌属增多、梭菌属含量降低是该类人群特征性的肠道菌群特点,这可能是导致这类患者出现疲劳、头痛、淡漠的主要原因^[21]。研究证实,另支菌属可影响色氨酸的利用,破坏肠道内 5-羟色胺能系统的平衡,进而抑制脑电活性,这可能是导致认知功能障碍的原因之一^[22]。本研究表明,通过粪菌移植改善脓毒症大鼠肠道菌群的结构,可改善大鼠的认知功能,减轻脑皮质中的炎症反应。

肠道菌群参与了脑内胆碱能抗炎通路的调节。Gomez-Eguilaz 等^[23]研究发现,胆碱能抗炎通路介导肠道菌群可调节阿尔茨海默病、多发性硬化症、帕金森病等神经系统疾病。Sgritta 等^[24]研究发现,给自闭症大鼠喂食乳酸杆菌,可通过胆碱能抗炎通路提高其社会适应性。Klingbeil 和 de La Serre^[25]研究发现,通过补充高纤维膳食可以纠正高脂肪饮食大鼠的肠道菌群紊乱,提升肠道菌群多样性,增加双歧杆菌科、丹毒丝菌科、毛螺旋菌科、瘤胃球菌科的含量,这些菌科均是正常肠道微生态的标志;并通过胆碱能抗炎通路减轻脑部的炎症反应,降低 TNF- α 等炎性介质的含量,改善认知功能障碍。Bravo 等^[26]研究发现,补充乳酸杆菌可以缓解抑郁状态,切断迷走神经阻断胆碱能抗炎通路后,乳酸杆菌这一作用消失。有研究表明,厚壁菌门、拟杆菌门减少,变形菌门增多,可使有害代谢物产生增多,短链脂肪酸等有益代谢物减少,胆碱能抗炎通路活性降低,小胶质细胞被激活,炎性因子产生增多,从而

加重痴呆^[27]。Wan 等^[28]研究发现,与低脂饮食相比,高脂饮食6个月后,健康人群肠道内另支菌属上升,梭菌属下降,同时促炎炎性介质TNF-α、IL-6、IL-1β升高,抑炎炎性介质IL-10下降。本研究表明,粪菌移植大鼠肠道菌群失衡得到改善,脑皮质中α7nAChR表达明显增多,Iba-1表达下降,同时脑皮质中TNF-α、IL-6、IL-1β表达下降,脑电图异常减少,可作为SAE好转的标志^[29],SAE程度减轻。

本研究的局限性:①应用无菌鼠对肠道菌群与脑功能之间的关系进行研究,可排除菌群之间的相互影响,本课题组未来计划应用无菌鼠进一步研究;②检测肠道菌群多样性及结构仅是初步研究,本研究团队计划应用宏基因组技术对肠道菌群的代谢通路行进一步研究。

综上所述,粪菌移植可能通过纠正脓毒症大鼠的肠道菌群紊乱,上调胆碱能抗炎通路的活性,抑制小胶质细胞激活,降低促炎因子表达,从而减轻SAE,但这一机制仍有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ehler J, Saller T, Wittstock M, et al. Diagnostic value of NT-proCNP compared to NSE and S100B in cerebrospinal fluid and plasma of patients with sepsis-associated encephalopathy [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 692: 167–173. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.11.014.
- [2] 李素彦,徐鑫,杨运强,等.不同时期应用益生菌对脓毒症患者肠道菌群及短链脂肪酸的影响[J].河北医药,2015,37(23):3567–3571. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2015.23.015.
Li SY, Xu X, Yang YQ, et al. Effects of probiotics in different periods on intestinal flora and short-chain fatty acids in patients with sepsis [J]. *Hebei Med J*, 2015, 37 (23): 3567–3571. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2015.23.015.
- [3] Li S, Lv J, Li J, et al. Intestinal microbiota impact sepsis associated encephalopathy via the vagus nerve [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 662: 98–104. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.10.008.
- [4] Schuitem TJ, Lankelma JM, Scicluna BP, et al. The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia [J]. *Gut*, 2016, 65 (4): 575–583. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309728.
- [5] Fareed S, Sarode N, Stewart FJ, et al. Applying fecal microbiota transplantation (FMT) to treat recurrent *Clostridium difficile* infections (rCDI) in children [J]. *PeerJ*, 2018, 6: e4663. DOI: 10.7717/peerj.4663.
- [6] Kanashiro A, Sônego F, Ferreira RG, et al. Therapeutic potential and limitations of cholinergic anti-inflammatory pathway in sepsis [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 117: 1–8. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.12.014.
- [7] Stakenborg N, Wolthuis AM, Gomez-Pinilla PJ, et al. Abdominal vagus nerve stimulation as a new therapeutic approach to prevent postoperative ileus [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2017, 29 (9): 72–81. DOI: 10.1111/nmo.13075.
- [8] Gao Y, Kang K, Zhang X, et al. Effect of splenectomy on attenuation of LPS-induced AKI through GTS-21-induced cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11 (4): 2540–2549.
- [9] Frasch MG, Szynkaruk M, Prout AP, et al. Decreased neuroinflammation correlates to higher vagus nerve activity fluctuations in near-term ovine fetuses: a case for the afferent cholinergic anti-inflammatory pathway? [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13 (1): 103. DOI: 10.1186/s12974-016-0567-x.
- [10] Zhu YJ, Peng K, Meng XW, et al. Attenuation of neuroinflammation by dexmedetomidine is associated with activation of a cholinergic anti-inflammatory pathway in a rat tibial fracture model [J]. *Brain Res*, 2016, 1644: 1–8. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.04.074.
- [11] Garzoni L, Faure C, Frasch MG. Fetal cholinergic anti-inflammatory pathway and necrotizing enterocolitis: the brain-gut connection begins in utero [J]. *Front Integr Neurosci*, 2013, 7: 57. DOI: 10.3389/fint.2013.00057.
- [12] Kong W, Kang K, Gao Y, et al. GTS-21 protected against LPS-induced sepsis myocardial injury in mice through α7nAChR [J]. *Inflammation*, 2018, 41 (3): 1073–1083. DOI: 10.1007/s10753-018-0759-x.
- [13] Han YG, Qin X, Zhang T, et al. Electroacupuncture prevents cognitive impairment induced by lipopolysaccharide via inhibition of oxidative stress and neuroinflammation [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 683: 190–195. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.06.003.
- [14] Franco Bocanegra DK, Nicoll JAR, Boche D. Innate immunity in Alzheimer's disease: the relevance of animal models? [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2018, 125 (5): 827–846. DOI: 10.1007/s00702-017-1729-4.
- [15] Burrello C, Giuffrè MR, Macandog AD, et al. Fecal microbiota transplantation controls murine chronic intestinal inflammation by modulating immune cell functions and gut microbiota composition [J]. *Cells*, 2019, 8 (6). pii: E517. DOI: 10.3390/cells8060517.
- [16] McIntosh CM, Chen L, Shaiber A, et al. Gut microbes contribute to variation in solid organ transplant outcomes in mice [J]. *Microbiome*, 2018, 6 (1): 96. DOI: 10.1186/s40168-018-0474-8.
- [17] Wrzosek L, Ciocan D, Borentain P, et al. Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 6854. DOI: 10.1038/s41598-018-25300-3.
- [18] Sasmith AO. Modification of the gut microbiome to combat neurodegeneration [J]. *Rev Neurosci*, 2019 [2019-07-01]. [published online ahead of print May 16, 2019]. DOI: 10.1515/reneuro-2019-0005.
- [19] Cui B, Su D, Li W, et al. Effects of chronic noise exposure on the microbiome-gut-brain axis in senescence-accelerated prone mice: implications for Alzheimer's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15 (1): 190. DOI: 10.1186/s12974-018-1223-4.
- [20] Berding K, Donovan SM. Diet can impact microbiota composition in children with autism spectrum disorder [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 515. DOI: 10.3389/fnins.2018.00515.
- [21] Nagy-Szakal D, Williams BL, Mishra N, et al. Fecal metagenomic profiles in subgroups of patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome [J]. *Microbiome*, 2017, 5 (1): 44. DOI: 10.1186/s40168-017-0261-y.
- [22] Del RA, McDermott MM, Panee J. Effects of a high-fat diet and bamboo extract supplement on anxiety- and depression-like neurobehaviours in mice [J]. *Br J Nutr*, 2012, 108 (7): 1143–1149. DOI: 10.1017/S0007114511006738.
- [23] Gomez-Eguilaz M, Ramon-Trapero JL, Perez-Martinez L, et al. The microbiota-gut-brain axis and its great projections [J]. *Rev Neurol*, 2019, 68 (3): 111–117.
- [24] Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, et al. Mechanisms underlying microbial-mediated changes in social behavior in mouse models of autism spectrum disorder [J]. *Neuron*, 2019, 101 (2): 246–259. e6. DOI: 10.1101/j.neuron.2018.11.018.
- [25] Klingbeil E, de La Serre CB. Microbiota modulation by eating patterns and diet composition: impact on food intake [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2018, 315 (6): R1254–R1260. DOI: 10.1152/ajpregu.00037.2018.
- [26] Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 (38): 16050–16055. DOI: 10.1073/pnas.1102999108.
- [27] Welcome MO. Gut microbiota disorder, gut epithelial and blood-brain barrier dysfunctions in etiopathogenesis of dementia: molecular mechanisms and signaling pathways [J]. *Neuromolecular Med*, 2019, 21 (3): 205–226. DOI: 10.1007/s12017-019-08547-5.
- [28] Wan Y, Wang F, Yuan J, et al. Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial [J]. *Gut*, 2019, 68 (8): 1417–1429. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-317609.
- [29] Azabou E, Magalhaes E, Braconnier A, et al. Early standard electroencephalogram abnormalities predict mortality in septic intensive care unit patients [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (10): e0139969. DOI: 10.1371/journal.pone.0139969.

(收稿日期:2019-07-17)