

# 早期和进展期阿尔茨海默病模型小鼠肠道菌群差异分析

周欢欢, 骆澜, 秦立强, 万忠晓

(苏州大学医学部公共卫生学院)

**摘要:** 目的: 分析临床早期和进展期阿尔茨海默病 (AD) 模型小鼠的肠道菌群差异, 以探讨肠道菌群变化在 AD 进展过程中的可能作用。方法: 以 10 (Young) 和 24 (Aged) 周龄 APP/PS1 小鼠为动物模型, 给予 AIN93G 标准饲料喂养 16 周后, 收集小鼠粪便进行 16S rRNA 基因测序分析肠道菌群组成。结果: 与 Young 组相比, Aged 组小鼠肠道菌群的  $\alpha$  多样性显著下降; 颤螺旋菌属 (Oscillospira)、拟杆菌属 (Bacteroides) 和杆菌纲 (Bacilli) 增加, 而瘤胃球菌属 ([Ruminococcus]) 减少; KEGG 分析显示非同源末端连接、蛋白激酶、磷酸肌醇代谢等功能途径增加, 而内质网蛋白加工等途径减少。结论: 老年 APP/PS1 小鼠肠道菌群稳态失衡, PICRUST 预测到相关生物功能发生改变, 肠道菌群的变化可能在年龄相关 AD 病理进程中发挥重要作用。

**关键词:** 阿尔兹海默症; 肠道菌群; 16S rRNA; 年龄; APP/PS1 小鼠

**中图分类号:** TS201.4

## Analysis of gut microbiota in Difference analysis of gut microbiota between early and advanced Alzheimer's disease mice

ZHOU Huanhuan, LUO Lan, QIN Liqiang, WAN Zhongxiao

(School of public health, Medical College of Soochow University, Suzhou 215000)

**Abstract:** Objective: To investigate the possible role of gut microbiota in the progression of Alzheimer's disease (AD) by analyzing the gut microbiota profiles of early and advanced Alzheimer's disease mice. Methods: APP / PS1 mice aged 10-week-old (Young) and 24-week-old (Aged) were used as animal models, and were fed with standard AIN93G diet for 16 weeks. Feces of mice were collected for 16S rRNA gene sequencing to determine the characteristics of gut microbiota. Results: Compared with Young group, the  $\alpha$  diversity of gut microbiota from Aged group was significantly decreased; the relative abundance of Oscillospira, Bacteroides and Bacilli were significantly increased, while Ruminococcus was decreased; non-homologous end-joining, protein kinases, inositol phosphate metabolism and other functional pathways were increased, while protein processing in endoplasmic reticulum was decreased. Conclusion: The homeostasis of gut microbiota in aged APP/PS1 mice was disordered, predicted related biological functions have changed and these changes may play an essential role in the age associated pathological process of AD.

**Key words:** Alzheimer's disease; gut microbiota; 16S rRNA; age; APP / PS1 mice

## 0 引言

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的表现为进行性认知功能障碍的神经退行性疾病。预计到 2040 年, 神经退行性疾病将成为仅次于心血管疾病的世界第二大死

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81872609)

作者简介: 周欢欢 (1995-), 女, 营养与阿尔兹海默症

通信联系人: 万忠晓 (1983-), 女, 教授、博导, 阿尔兹海默症的营养防治. E-mail: zhxwan@suda.edu.cn

因<sup>[1]</sup>。据报道,中国 65 岁以上人群 AD 患病率为 3.21%,目前约 700 多万人患有 AD<sup>[2]</sup>。据统计 2015 年我国平均每位 AD 患者的年度总费用为 1677.4 亿美元<sup>[3]</sup>。因此,AD 给家庭及社会带来了沉重的经济负担。AD 的经典病理学特征是 A $\beta$  斑块的细胞外聚集和神经原纤维缠结(NFTs)的细胞内聚集<sup>[4]</sup>。近年来人们逐渐认识到肠道菌群也是影响 AD 的一个关键因素<sup>[5,6]</sup>。最近的共识是,肠道菌群结构会随年龄和疾病状态而发生改变<sup>[7]</sup>,肠道菌群多样性会随着年龄的增长而下降<sup>[8]</sup>。越来越多的证据表明,肠道菌群可能通过神经内分泌和免疫途径与中枢神经系统产生联系<sup>[9-12]</sup>。目前肠道菌群参与 AD 发病机理主要有以下几种可能假说:肠道菌群代谢产物可诱导神经炎症和脑血管变性<sup>[13]</sup>;肠道菌群受损会抑制自噬介导的蛋白质清除过程<sup>[14]</sup>;肠道菌群可以产生  $\gamma$ -氨基丁酸、5-羟色胺和多巴胺等神经递质<sup>[15]</sup>;肠道菌群失调会导致肥胖、胰岛素抵抗<sup>[16]</sup>,间接增加 AD 患病风险。

APPswe/PS1De9 (APP/PS1) 小鼠是目前应用最广泛的 AD 转基因小鼠模型之一。APP/PS1 小鼠表现出一系列年龄相关的认知功能障碍及 AD 病理学改变。如从 4 月龄开始出现 A $\beta$  斑块,6 月龄时神经胶质细胞活化,放射臂水迷宫试验可检测到认知功能缺陷,8 月龄时认知缺陷加重,12~13 月龄时 Morris 水迷宫试验可检测到认知障碍<sup>[17]</sup>。据报道,与野生型小鼠相比,APP/PS1 小鼠的幽门螺杆菌科和脱硫弧菌科的丰度显著增加<sup>[18]</sup>。也有研究显示,月龄较高的 APP/PS1 小鼠的肠道颤螺旋菌属、拟杆菌属、瘤胃球菌属和帕拉普氏菌属的相对丰度较年轻者高<sup>[19]</sup>。

目前肠道衰老的机制尚未阐明,肠道菌群在 AD 发生发展进程中的作用尚未完全明确。本文以 6 月龄及 10 月龄 APP/PS1 小鼠为模型,分别模拟 AD 临床前期和 AD 临床早期状态,分析不同年龄阶段 AD 小鼠肠道菌群的差异,探讨不同年龄阶段肠道菌群变化对 AD 的可能影响,从而为未来肠道菌群在防治 AD 方面的研究提供重要理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

AIN93G 饲料购自江苏美迪森生物医药有限公司,Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (M0531)试剂盒购自美国 NEB 公司,Agencourt AMPure XP 60ml Kit (A63881) 试剂盒购自美国 Beckman Coulter 公司,AXYGEN Gel Extraction Kit (250) (AP-GX-250G) 试剂盒来自美国 AXYGEN 公司,Qubit dsDNA HS Assay Kit (Q32851) 试剂盒来自美国 Thermo Fisher 公司,文库定量试剂盒 (KK4824) 来自美国 KAPA 公司,Hiseq3000/4000 SBS Reagent Kit (300cycle) (FC-410-1003)来自美国 Illumina 公司。

### 1.2 仪器设备

本研究中用到的主要仪器设备见表 1。

表 1 主要仪器设备

Tab. 1 Instrument and equipment

名称	生产厂家
台式高速冷冻离心机	德国 Eppendorf 有限公司
Nanodrop 超微量核酸蛋白测定仪	美国 Thermo Fisher 公司

PCR 仪	杭州博日科技有限公司
凝胶成像系统	美国 BIO-RAD 公司
Qubit2.0	美国 Thermo Fisher 公司
核酸分析仪	美国 Agilent 公司
实时荧光定量 PCR 仪	德国 Eppendorf 有限公司
高通量测序仪	美国 Illumina 公司

### 1.3 动物实验设计

SPF 级雄性 APP/PS1 转基因小鼠 14 只, B6C3F1 背景, APPswe 品系, 购于南京大学模式动物研究所。其中, 10 周龄小鼠 7 只 (即年轻组, Young, 用于模拟 AD 临床前期), 24 周龄小鼠 7 只 (即老龄组, Aged, 用于模拟 AD 临床早期), 适应性喂养一周后两组小鼠均给予 AIN93G 标准饲料进行喂养, 总周期为 16 周。所有动物程序均遵循动物护理和使用指南, 并经苏州大学动物福利委员会批准。所有小鼠均饲养在 SPF 级条件下, 12/12h 的明暗周期, 温度保持在 20-25℃, 湿度稳定在 50-60%。整个研究期间, 所有小鼠均可以自由进食和饮水, 每周称量小鼠体重和食物摄入量。

### 1.4 粪便肠道菌群分析

#### 1.4.1 DNA 提取及检测

高通量测序文库的构建和基于 Illumina HiSeq 平台的测序由杭州谷禾信息技术有限公司完成。收集 80~120mg 小鼠粪便置于无菌的 2ml 离心管中, 采用 SDS 裂解液冻融法进行 DNA 提取, 通过 PowerMax (粪便/土壤) DNA 提取试剂盒 (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) 提取 DNA, 储存于在 -20 ° C。以 1% 琼脂糖凝胶电泳试验测定 DNA 完整性。采用 NanoDrop ND-1000 分光光度计 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) 测定 DNA 的数量和质量。

#### 1.4.2 16s rDNA 扩增子焦磷酸测序

使用引物从基因组 DNA 中扩增出 16S rRNA 的 V3-V4 高变区。细菌 16S rRNA 基因 V4 区采用正向引物 515F (5' -GTGCCAGCMGCCGCGGTAA -3') 和反向引物 806R (5' -GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50μl: 25μl PhusionHigh-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer 为高保真酶。前后 F/R 引物各 3 μl (10uM)。10 μl DNA 模板以及 6μl ddH2O。配置好的 PCR 体系按如下条件进行 PCR 扩增: 预变性 98 ° C 30s, 接下来 25 个循环: 变性 98° C 15s 退火 58° C 15s 延伸 72° C 15s。终延伸 72° C 1min。采用 AMPureXP Beads (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) 对产物进行纯化, 并且使用 PicoGreen dsDNA, Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 量化。最后用 Illumina HiSeq4000 pair-end 2×150 bp 平台对扩增产物进行标准化、汇集和测序。序列分析

根据 Barcode 序列和引物序列从原始数据中拆分各个样本的数据。截去 Barcode 和引物序列后使用 Vsearchv2.4.4 对每个样品的 reads 进行拼接, 得到原始 Tags 数据 (Raw Tags)。同时对序列质量进行质控和过滤。筛选低质量序列的标准是: 序列小于 150bp, 平均质量值低于 20, 含有不明确碱基的序列, 以及含有 >8bp 的单核苷酸重复序列, 去除嵌合体序列, 得到最终有效数据 (Effective Tags)。

### 1.4.3 序列分析

根据 Barcode 序列和引物序列从原始数据中拆分各个样本的数据。截去 Barcode 和引物序列后使用 Vsearchv2.4.4 对每个样品的 reads 进行拼接, 得到原始 Tags 数据 (Raw Tags)。同时对序列质量进行质控和过滤。筛选低质量序列的标准是: 序列小于 150bp, 平均质量值低于 20, 含有不明确碱基的序列, 以及含有>8bp 的单核苷酸重复序列, 去除嵌合体序列, 得到最终有效数据 (Effective Tags)。

### 1.4.4 OUT 聚类 and 物种注释

以 97% 相似度将序列聚类成可操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs)。使用 QIIME 软件计算 OTU 水平  $\alpha$  多样性指数, 包括 Chao1, ACE, Shannon, Simpson 指数等, 同时生成 OTU 水平 ranked abundance 曲线, 绘制稀释曲线。采用 Qimme 软件计算 UniFrac 距离度量<sup>[20, 21]</sup>绘制 PCoA, NMDS 图对不同样本的微生物群落结构进行  $\beta$  多样性分析。高级生物信息分析及统计比较。

### 1.4.5 高级生物信息分析及统计比较

采用 Student's t-test 检验和 the Monte Carlo permutation test 检验比较组间的 Unifrac 距离的差异。通过 MEGAN 软件<sup>[22]</sup>和 GraPhlAn<sup>[23]</sup>将微生物分类组学和丰度可视化。基于 R 包 “VennDiagram” 生成 Venn 图, 将样本间或组间共有和独有的 OTUs 可视化。使用 R stats 包的 Kruskal 方法比较样本间或组间各分类水平的差异。使用 LEfSe 分析默认设置检测各组间不同分类水平上的差异。使用 R 包 “randomForest” 进行随机森林分析比较组间差异。基于 PICRUSt 预测微生物功能<sup>[24]</sup>。使用 MetagenomicProfiles (STAMP) 软件包 v2.1.3<sup>[25]</sup>对输出文件进一步处理进行功能预测分析。利用 Parallel-META 3 (version 3.3.2) 完成基于 MetaStorms 距离在物种和功能上的  $\beta$  多样性分析。

## 1.5 统计与分析

所有数据与结果均表示为均值和标准误 (MEAN $\pm$ SEM), 采用 SPSS21.0 软件对数据进行统计分析, 运用 Graphpad Prism 7.0 软件作图。若无特殊说明, 以  $p<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高通量测序数据的基本特征

本研究从 14 个样本中共获得 1495342 条原始序列, 将原始序列进行过滤、拼接后共得到 1018288 条有效序列, 每个样本平均读取 78330 条有效序列 (最少一个样本为 33168 条, 最大为 117870 条)。在特定 97% 的相似度下将 Tags 聚类成 OTUs, 如图 1A 所示, Young 组小鼠共检测到 792 个 OTUs, 其中 239 个为 Young 组小鼠所特有; Aged 组小鼠共检测到 701 个 OTUs, 其中 148 个为 Aged 组小鼠所特有。如图 1B 丰度等级曲线所示, 折线在横轴的长度越长表明群落丰富度越大, 折线越平缓表明群落的均匀度越好, 可知 Young 组小鼠肠道菌群所含物种的丰富度和均匀度均较 Aged 组小鼠好。

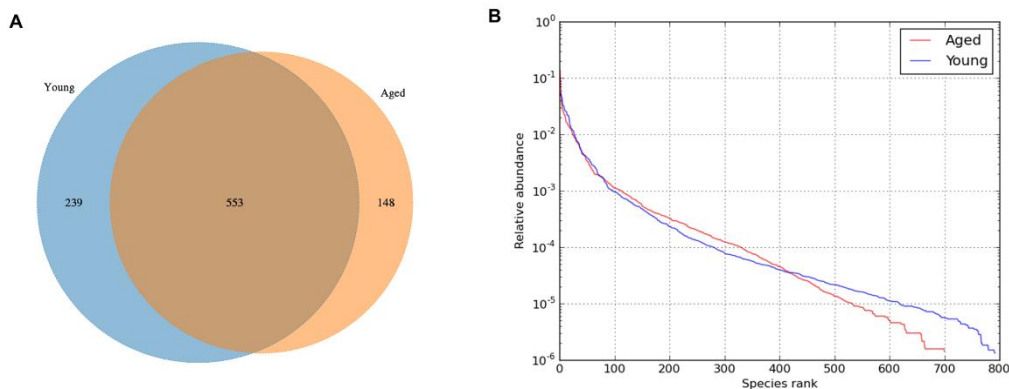


图 1 两组小鼠肠道菌群丰度

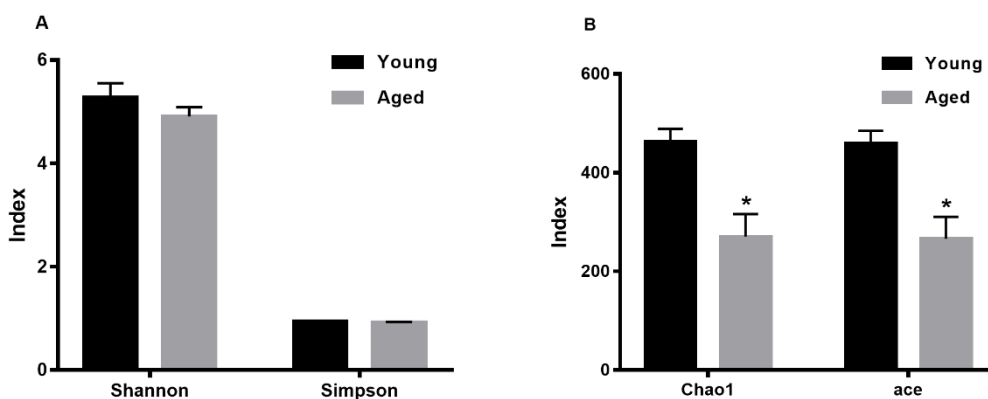
Fig. 1 Community abundance of gut microbiota in two groups

A-Venn 图; B-丰度等级曲线

A-Venn diagram; B-Rankabundance curve

## 2.2 菌群多样性分析

共计算了四个  $\alpha$  多样性测量值, 包括 Shannon、Simpson、Chao1 和 ACE 多样性指数 (图 2A-B)。我们发现不同年龄段的 Shannon 和 Simpson 多样性没有显著差异。而 Aged 组小鼠肠道菌群的 ACE 和 Chao1 多样性指数显著低于 Young 组小鼠 ( $p < 0.05$ ), 显示出较低多样性和丰富性。如图 3A-B 所示, 利用主坐标分析 (Principal component analysis, PCoA) 是和非度量多维尺度分析 (Nonmetric Multidimensional Scaling, NMDS) 检验了群落结构之间的关系。PCoA 结果表明, PC1 可以解释 33.58% 的方差, PC2 可以解释 17.05% 的方差, 两轴总解释率达 50.63%。NMDS 分析结果同样显示两组样品明显地按年龄不同分开分布, 而组内呈现聚集趋势。以上分析表明, 年轻组和老龄组小鼠粪便微生物群落结构有显著差异。

图 2  $\alpha$  多样性分析结果Fig. 2 The results of  $\alpha$  diversity analysis

A-Shannon 和 Simpson 指数; B-Chao1 和 ace 指数

A-The index of Shanon and Simpson; B-The index of Chao1 and ace



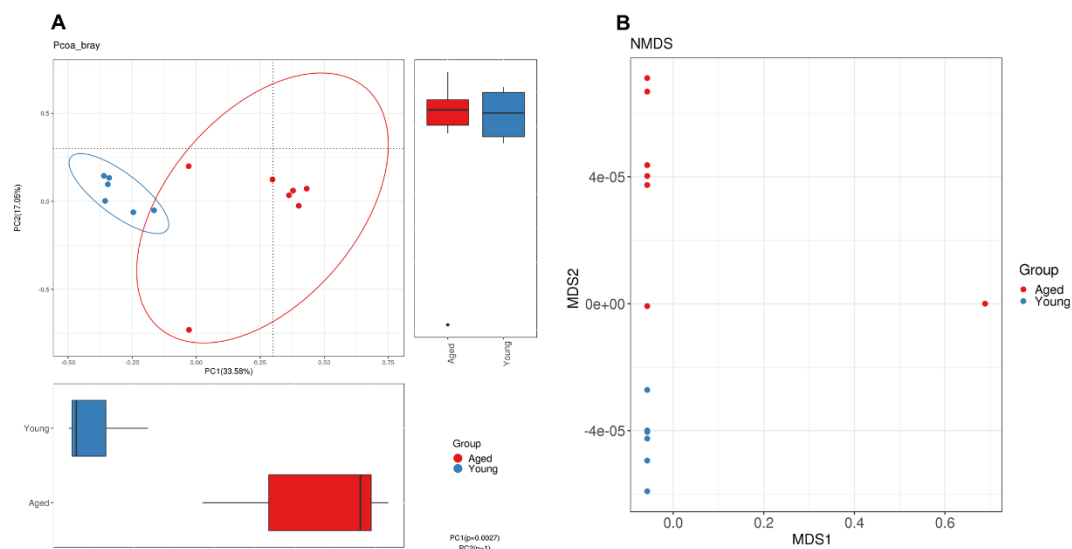


图 3  $\beta$  多样性分析结果

Fig. 3 The results of  $\beta$  diversity analysis

A-主坐标分析；B-非度量多维尺度分析

A-Principal Component Analysis；B-Nonmetric Multidimensional Scaling

2.3 菌群组成与相对丰度分析

经 OTU 的聚类 and 物种注释分析，可以获得基于门和属水平下的两组小鼠肠道菌群丰度排名前十的物种相对丰度构成（表 2）（图 4A-B）。在门水平下（图 4A），两组小鼠粪便菌群的主要优势菌均为厚壁菌门（Firmicutes）、拟杆菌门（Bacteroidetes）和变形菌门（Proteobacteria）。为进一步对两组样本进行显著性差异分析，利用 Mann-Whitney U 检验来进行差异分析，结果显示，与 Young 组相比，Aged 组小鼠肠道中拟杆菌门（Bacteroidetes）相对丰度降低了近 4 倍（10.93% vs. 42.23%）；而放线菌门（Actinobacteria）、TM7 菌的相对丰度在 Aged 组小鼠肠道中显著升高。在属水平上(图 4B)，Young 组小鼠肠道菌群以拟杆菌属（Bacteroides）、副拟杆菌属（Parabacteroides）、颤螺旋菌属（Oscillospira）为三大优势菌属，而 Aged 组小鼠则以拟杆菌属（Bacteroides）、脱硫弧菌属（Desulfovibrio）、颤螺旋菌属（Oscillospira）为三大优势菌属。差异分析结果显示，与 Young 组相比，Aged 组小鼠肠道中瘤胃球菌属（[Ruminococcus]）的相对丰度显著降低；而拟杆菌属（Bacteroides）、双歧杆菌属（Bifidobacterium）的相对丰度在 Aged 组小鼠肠道中显著升高，且 Aged 组双歧杆菌属（Bifidobacterium）的相对丰度是 Young 组的 6 倍（0.66% vs. 0.11%）。

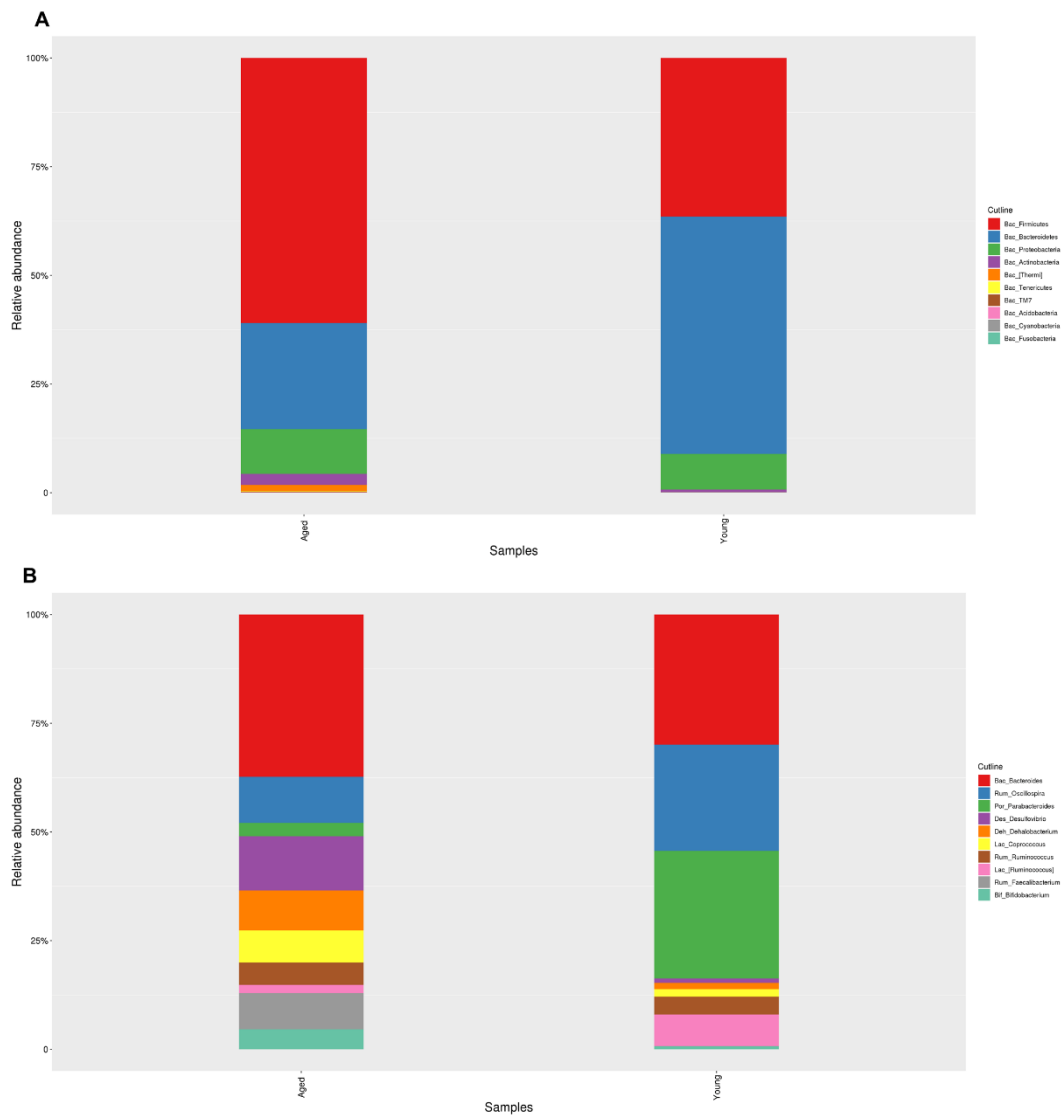


图 4 肠道菌群组成变化

Fig. 4 Alterations in gut microbiota composition

A-门水平; B-属水平

A-Phylum level; B-Genus level

表 2 年轻和老年组 APP/PS1 小鼠肠道菌群在门和属水平下前十的物种相对丰度 (%)

Tab. 2 The relative abundance of the top 10 gut bacterial genera at the phylum and genus level (%) from both young and aged APP/PS1 mice

Level	Group	
Phylum	Young	Aged
Firmicutes	28.17 ± 8.08	27.31 ± 4.64
Bacteroidetes	42.23 ± 9.63	10.93 ± 5.80*
Proteobacteria	6.32 ± 2.85	4.60 ± 1.75
Actinobacteria	0.51 ± 0.27	1.14 ± 0.25*
[Thermi]	0.02 ± 0.02	0.63 ± 0.61
Tenericutes	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.03
TM7	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.05*
Acidobacteria	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.03

Cyanobacteria	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Fusobacteria	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00
<b>Genus</b>	<b>Young</b>	<b>Aged</b>
Bacteroides	4.78 ± 0.76	5.39 ± 4.88*
Oscillospira	3.90 ± 1.37	1.53 ± 0.50
Parabacteroides	4.69 ± 4.21	0.44 ± 0.42
Desulfovibrio	0.17 ± 0.12	1.80 ± 1.73
Dehalobacterium	0.22 ± 0.09	1.33 ± 0.62
Coprococcus	0.29 ± 0.14	1.07 ± 0.72
Ruminococcus <sup>a</sup>	0.65 ± 0.24	0.74 ± 0.17
[Ruminococcus] <sup>b</sup>	1.16 ± 0.37	0.27 ± 0.13*
Faecalibacterium	0.01 ± 0.00	1.20 ± 1.19
Bifidobacterium	0.11 ± 0.07	0.66 ± 0.15*

注: N=7; <sup>a</sup>, k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Clostridiales;f\_\_Lachnospiraceae;g\_\_[Ruminococcus];

<sup>b</sup>, k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Clostridiales;f\_\_Ruminococcaceae;g\_\_Ruminococcus;\*, 与 Young 组相比, Mann-Whitney U 检验 p<0.05。

进一步进行了基于线性判别分析 (Linear discriminant analysis, LDA) 的 LEfSe 分析, 筛选组间差异显著物种, 即组间生物标志物。如图 5 所示, 在 Aged 组小鼠中显著增加的生物标志物共有 24 种, 包括毛螺菌科 (Lachnospiraceae)、杆菌纲 (Bacilli)、 $\gamma$ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、乳杆菌目 (Lactobacillales)、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)、肠杆菌目 (Enterobacteriales)、放线菌门 (Actinobacteria)、放线菌纲 (Actinobacteria)、双歧杆菌目 (Bifidobacteriales)、双歧杆菌属 (Bifidobacterium)、乳杆菌科 (Lactobacillaceae)、乳杆菌属 (Lactobacillus)、链球菌科 (Streptococcaceae)、帕拉普氏菌科 ([Paraprevotellaceae])、链球菌属 (Streptococcus)、 $\beta$  变形菌纲 (Betaproteobacteria)、伯克氏菌目 (Burkholderiales)、多尔氏菌属 (Dorea)、AF12、乳球菌属 (Lactococcus)、TM7-3、TM7 和双歧杆菌科 (Bifidobacteriaceae)。相反, 共有 7 种细菌生物标志物在 Young 组显著增加, 包括拟杆菌属 (Bacteroidetes)、拟杆菌纲 (Bacteroidia)、理研菌科 (Rikenellaceae)、拟杆菌目 (Bacteroidales)、普雷沃菌属 ([Prevotella])、新鞘脂菌属 (Novosphingobium) 以及 SMB53。

## 2.4 菌群代谢功能预测分析

随后进行了基于 16S rRNA 序列的 PICRUSt 功能预测, 即通过对已有测序微生物基因组的基因功能的构成分析, 预测不同样本和分组之间在功能上的差异。PICRUSt 功能预测获得了 KEGG 代谢途径第三层分类水平的功能基因丰度富集情况 (图 6)。如图 6 所示, 预测到 KEGG 有 31 条代谢途径在两个年龄组中呈现显著差异。结果表明, Aged 组小鼠的微生物群在减数分裂酵母、N-聚糖生物合成的各种类型、转录机、DNA 复制、内质网蛋白加工、DNA 复制蛋白、半乳糖代谢、鞘糖脂生物合成、能量代谢-未分类、转运蛋白、RNA 降解、结核病、细菌毒素、新生霉素生物合成、前列腺癌、叶酸单碳池共 16 个方面的功能表达较 Young 组低, 而 Aged 组小鼠预测到苯乙烯降解、RIG 样受体信号通路、不饱和脂肪酸的生物合成、非同源末端连接、苯甲酸盐降解、脂肪酸代谢、醚脂代谢、细胞色素 p450 对外源物质的代谢作用、药物代谢-细胞色素 P450、蛋白激酶、磷酸肌醇代谢、氯环己烷和氯苯的降解、己内酰胺降解、膀胱癌、酮体的合成与降解共 15 个通路表达较 Young 组活跃。



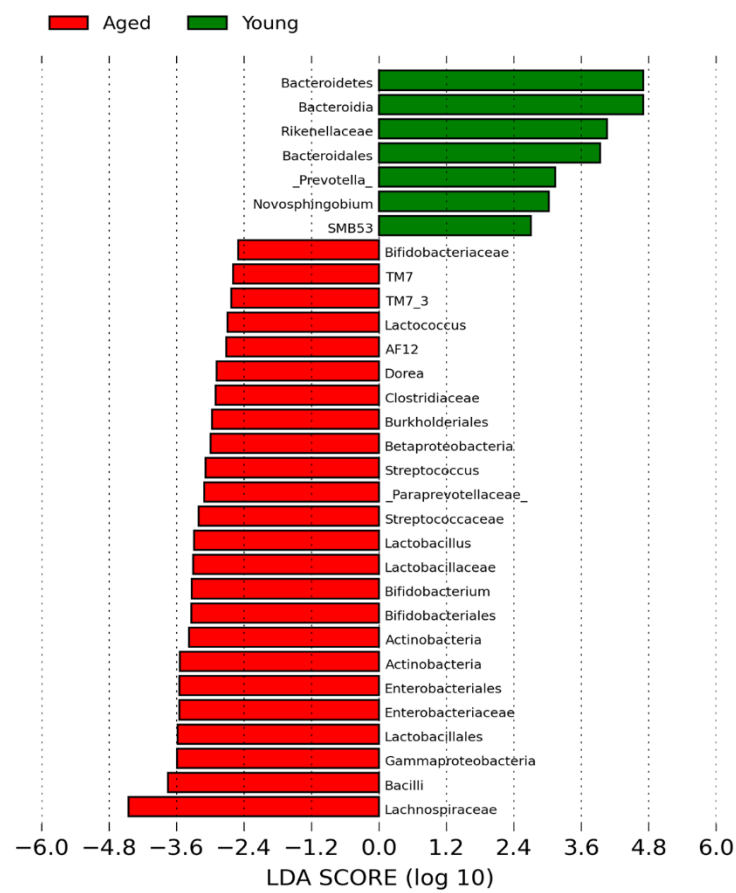


图 5 LEfSe 分析结果  
Fig. 5 The results of LEfSe analysis

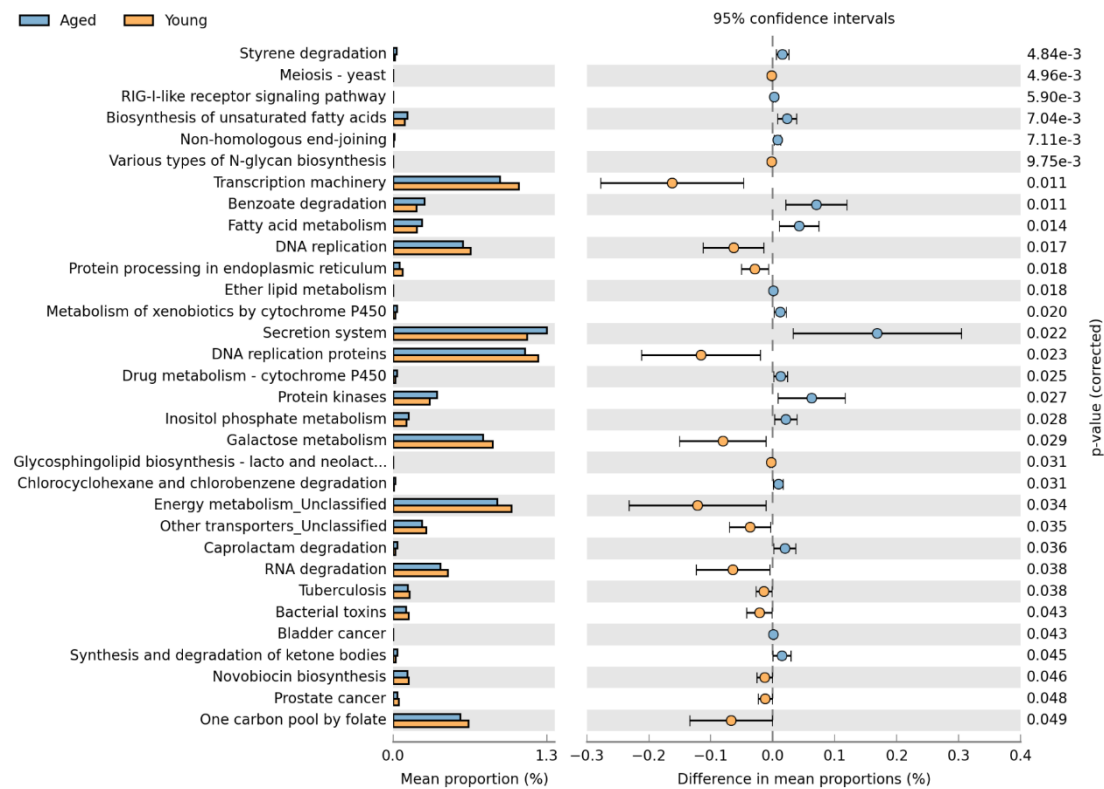


图 6 菌群代谢功能预测分析结果

Fig. 6 The results of prediction of microbial metabolic function

### 3 讨论

本研究比较了不同年龄 AD 模型小鼠的肠道菌群的差异。我们发现, 相对于年轻小鼠, 老年小鼠肠道菌群的丰富度和多样性均显著下降; 拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和瘤胃球菌属 (*[Ruminococcus]*) 的相对丰度显著下降, 而放线菌门 (*Actinobacteria*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、杆菌纲 (*Bacilli*) 的相对丰度显著升高; PICRUST 功能预测显示蛋白激酶、非同源末端连接、磷酸肌醇代谢等功能途径增加, 而内质网蛋白加工等途径减少。

人类肠道菌群含有 $\sim 10^{14}$  个微生物细胞, 数量大约是人类宿主细胞的 100 倍, 肠道菌群的微生物基因数量比人类宿主基因的数量高出大约 150 倍, 这些微生物共同构成了比肝脏代谢更活跃的人体最大“扩散器官系统”<sup>[26]</sup>。在哺乳动物中, 肠道菌群参与食物加工、激活饱腹感途径、抵御病原体以及代谢产物的产生, 包括维生素、短链脂肪酸和次级胆汁酸<sup>[27,28]</sup>。肠道菌群的改变可能会增加肠道通透性, 诱发过敏反应, 并有利于胰岛素抵抗的发展, 胰岛素抵抗也与 AD 的风险有关<sup>[29]</sup>。据报道, 肠道微生物群组成与年龄相关的变化包括微生物群多样性的下降, 优势物种的丰度降低和次要优势物种丰度的增加<sup>[5]</sup>。在群落生态学的研究当中,  $\alpha$  多样性是对单个样本中的物种进行的多样性分析, 通过一系列指数来评估菌群物种的丰富度和多样性, 包括 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数; 通常, Chao1 和 ACE 指数反映了肠道微生物群落的丰富度, Shannon 和 Simpson 指数反映了群落内肠道菌群的多样性, 并受同一群落内物种丰富度和均匀度参数的影响。我们的结果显示, 老年组的 Chao1 指数和 ACE 指数显著降低, 表明老年小鼠肠道菌群的丰富度较年轻组显著下降。

据报道<sup>[19]</sup>, 在老年小鼠中, 颤螺旋菌属 (*Oscillospira*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 的相对丰度较年轻小鼠高, 这与我们菌群丰度的结果相一致。拟杆菌属在 2 型糖尿病患者<sup>[30]</sup>和帕金森病患者<sup>[31]</sup>的肠道中已发现具有较高水平; 同时该文献也报道了老年小鼠瘤胃球菌 (*Ruminococcus*) 的相对丰度也较年轻小鼠高, 而另一项报告则显示, APP/PS1 小鼠的瘤胃球菌 (*Ruminococcus*) 较野生型小鼠显著减少<sup>[18]</sup>。我们的结果显示老年小鼠瘤胃球菌 (*[Ruminococcus]*) 的相对丰度显著低于年轻小鼠。研究表明, 一些细菌如杆菌 (*Bacillus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、链霉菌 (*Streptomyces*) 等, 可能是淀粉样沉积的来源<sup>[26]</sup>。本研究通过 LEfSe 分析筛选组间差异标志物发现, 老年小鼠的肠道菌群中杆菌纲 (*Bacilli*) 的数量显著增加。这提示老年小鼠肠道细菌可能分泌更多的淀粉样蛋白, 进一步激活 AD 发病相关信号通路, 从而增强脑内 A $\beta$  积聚, 这个设想需要进一步验证。值得注意的是, 我们的研究结果显示老年小鼠双歧杆菌属丰度显著升高。双歧杆菌属是在整个生命周期中人类肠道中的重要细菌, 其对健康有益的影响已被充分证明<sup>[32,33]</sup>。但也有报道显示在欧洲人口中, 百岁老人的双歧杆菌组成仍然与成年人相似<sup>[34]</sup>, 并且广泛使用抗生素也是目前发现的老年人口中双歧杆菌丰度下降的重要原因<sup>[35]</sup>, 因此我们检测的老龄鼠中升高的双歧杆菌属的作用仍需进一步探讨。

正如 KEGG 分析预测的那样, 微生物组中的这些年龄相关变化可能会对多个过程产生影响。AD 患者神经病理学标记物的尸检发现海马组织中观察到高水平的 DNA 损伤<sup>[36]</sup>。非同源末端连接 (Non-homologous end-joining) 是 DNA 损伤修复的一个重要途径, 本研究中老年小鼠非同源末端连接通路增加可能提示老年小鼠相应的 DNA 损伤加剧。蛋白激酶

(Protein kinases) 是一种通过化学方式将三磷酸腺苷 (ATP) 的末端  $\gamma$ -磷酸基团添加到丝氨酸, 苏氨酸或酪氨酸残基上来修饰其他蛋白质的酶, 这一修饰过程也称为磷酸化<sup>[37]</sup>。KEGG 结果显示老年小鼠蛋白激酶功能途径较年轻小鼠显著增加, 而 Tau 蛋白磷酸化诱导的 NFTs 则是 AD 形成的重要病理特征。此外我们的研究发现, 老年小鼠磷酸肌醇代谢 (Inositol phosphate metabolism) 途径显著高于年轻小鼠, 磷酸肌醇可以诱导 A $\beta$  原纤维形成所必需的  $\beta$  结构转变<sup>[38]</sup>, 从而促进 A $\beta$  淀粉样蛋白的形成及聚集。内质网对蛋白质的加工包括糖基化、羟基化、酰基化、二硫键形成等, 其中最主要的是糖基化, 几乎所有内质网上合成的蛋白质最终都被糖基化, 而一些蛋白只有在糖基化之后才能正确折叠<sup>[39]</sup>, 如 APP 蛋白错误折叠形成的 A $\beta$  淀粉样蛋白<sup>[40, 41]</sup>。因此老年小鼠内质网蛋白加工 (Protein processing in endoplasmic reticulum) 途径较年轻小鼠减少也提示老年小鼠未经内质网修饰而发生错误折叠产生的 A $\beta$  淀粉样蛋白更多。

## 4 结论

综上所述, 我们认为 APP/PS1 小鼠表现出年龄相关的肠道菌群变化, 这些变化可能在 AD 的病理进程中发挥作用。关键变化主要包括老年小鼠肠道菌群  $\alpha$  多样性下降, 颤螺旋菌属 (Oscillospira)、拟杆菌属 (Bacteroides) 和杆菌纲 (Bacilli) 增加, 和瘤胃球菌属 ([Ruminococcus]) 减少。PICRUST 分析进一步证明, 老年小鼠的非同源末端连接、蛋白激酶、磷酸肌醇代谢等功能途径增加, 而内质网蛋白加工等关键途径减少。因此肠道菌群的改变可能是防治 AD 的关键途径之一, 但其影响 AD 的具体机制亟需进一步研究。

## [参考文献] (References)

- [1] Giaume C, Sáez J C, Song W, Leybaert L, Naus C C. Connexins and pannexins in Alzheimer's disease[J]. Neuroscience letters, 2019, 695:100-105.
- [2] Jia J, Wang F, Wei C, Zhou A, Jia X, Li F, Tang M, Chu L, Zhou Y, Zhou C, Cui Y, Wang Q, Wang W, Yin P, Hu N, Zuo X, Song H, Qin W, Wu L, Li D, Jia L, Song J, Han Y, Xing Y, Yang P, Li Y, Qiao Y, Tang Y, Lv J, Dong X. The prevalence of dementia in urban and rural areas of China[J]. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, 2014, 10(1):1-9.
- [3] Jia J, Wei C, Chen S, Li F, Tang Y, Qin W, Zhao L, Jin H, Xu H, Wang F, Zhou A, Zuo X, Wu L, Han Y, Han Y, Huang L, Wang Q, Li D, Chu C, Shi L, Gong M, Du Y, Zhang J, Zhang J, Zhou C, Lv J, Lv Y, Xie H, Ji Y, Li F, Yu E, Luo B, Wang Y, Yang S, Qu Q, Guo Q, Liang F, Zhang J, Tan L, Shen L, Zhang K, Zhang J, Peng D, Tang M, Lv P, Fang B, Chu L, Jia L, Gauthier S. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide[J]. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, 2018, 14(4):483-491.
- [4] 2015 Alzheimer's disease facts and figures[J]. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, 2015, 11(3):332-384.
- [5] Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, Severgnini M, Ostan R, Turrioni S, Consolandi C, Quercia S, Scurti M, Monti D, Capri M, Brigidi P, Candela M. Gut Microbiota and Extreme Longevity[J]. Current biology : CB, 2016, 26(11):1480-1485.
- [6] Naseer M I, Bibi F, Alqahtani M H, Chaudhary A G, Azhar E I, Kamal M A, Yasir M. Role of gut microbiota in obesity, type 2 diabetes and Alzheimer's disease[J]. CNS & neurological disorders drug targets, 2014, 13(2):305-311.
- [7] Lakshminarayanan B, Stanton C, O'Toole P W, Ross R P. Compositional dynamics of the human intestinal microbiota with aging: implications for health[J]. The journal of nutrition, health & aging, 2014, 18(9):773-786.
- [8] Lynch S V, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease[J]. The New England journal of medicine, 2016, 375(24):2369-2379.
- [9] Cryan J F, Dinan T G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour[J]. Nature reviews Neuroscience, 2012, 13(10):701-712.
- [10] Wong M L, Inerra A, Lewis M D, Mastronardi C A, Leong L, Choo J, Kentish S, Xie P, Morrison M, Wesselingh S L, Rogers G B, Licinio J. Inflammasome signaling affects anxiety- and depressive-like behavior and gut microbiome composition[J]. Molecular psychiatry, 2016, 21(6):797-805.
- [11] Pedersen H K, Gudmundsdottir V, Nielsen H B, Hyötyläinen T, Nielsen T, Jensen B A, Forslund K, Hildebrand

- F, Prifti E, Falony G, Le Chatelier E, Levenez F, Doré J, Mattila I, Plichta D R, Pöhö P, Hellgren L I, Arumugam M, Sunagawa S, Vieira-Silva S, Jørgensen T, Holm J B, Trošt K, Kristiansen K, Brix S, Raes J, Wang J, Hansen T, Bork P, Brunak S, Oresic M, Ehrlich S D, Pedersen O. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity[J]. *Nature*, 2016, 535(7612):376-381.
- [12] Sharon G, Sampson T R, Geschwind D H, Mazmanian S K. The Central Nervous System and the Gut Microbiome[J]. *Cell*, 2016, 167(4):915-932.
- [13] Zhao Y, Lukiw W J. Microbiome-generated amyloid and potential impact on amyloidogenesis in Alzheimer's disease (AD)[J]. *Journal of nature and science*, 2015, 1(7).
- [14] Bostanciklioğlu M. The role of gut microbiota in pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Journal of applied microbiology*, 2019, 127(4):954-967.
- [15] Galland L. The gut microbiome and the brain[J]. *Journal of medicinal food*, 2014, 17(12):1261-1272.
- [16] Moreno-Navarrete J M, Serino M, Blasco-Baque V, Azalbert V, Barton R H, Cardellini M, Latorre J, Ortega F, Sabater-Masdeu M, Burcelin R, Dumas M E, Ricart W, Federici M, Fernández-Real J M. Gut Microbiota Interacts with Markers of Adipose Tissue Browning, Insulin Action and Plasma Acetate in Morbid Obesity[J]. *Molecular nutrition & food research*, 2018, 62(3).
- [17] Malm T, Koistinaho J, Kanninen K. Utilization of APPswe/PS1dE9 Transgenic Mice in Research of Alzheimer's Disease: Focus on Gene Therapy and Cell-Based Therapy Applications[J]. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011, 2011:517160.
- [18] Shen L, Liu L, Ji H F. Alzheimer's Disease Histological and Behavioral Manifestations in Transgenic Mice Correlate with Specific Gut Microbiome State[J]. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2017, 56(1):385-390.
- [19] Zhang L, Wang Y, Xiayu X, Shi C, Chen W, Song N, Fu X, Zhou R, Xu Y F, Huang L, Zhu H, Han Y, Qin C. Altered Gut Microbiota in a Mouse Model of Alzheimer's Disease[J]. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2017, 60(4):1241-1257.
- [20] Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71(12):8228-8235.
- [21] Lozupone C A, Hamady M, Kelley S T, Knight R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73(5):1576-1585.
- [22] Huson D H, Mitra S, Ruscheweyh H J, Weber N, Schuster S C. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4[J]. *Genome research*, 2011, 21(9):1552-1560.
- [23] Asnicar F, Weingart G, Tickle T L, Huttenhower C, Segata N. Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn[J]. *PeerJ*, 2015, 3:e1029.
- [24] Langille M G, Zaneveld J, Caporaso J G, McDonald D, Knights D, Reyes J A, Clemente J C, Burkpile D E, Vega Thurber R L, Knight R, Beiko R G, Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature biotechnology*, 2013, 31(9):814-821.
- [25] Parks D H, Tyson G W, Hugenholtz P, Beiko R G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles[J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2014, 30(21):3123-3124.
- [26] Zhao Y, Dua P, Lukiw W J. Microbial Sources of Amyloid and Relevance to Amyloidogenesis and Alzheimer's Disease (AD)[J]. *Journal of Alzheimer's disease & Parkinsonism*, 2015, 5(1):177.
- [27] Breton J, Tonnoune N, Lucas N, Francois M, Legrand R, Jacquemot J, Goichon A, Guérin C, Peltier J, Pestel-Caron M, Chan P, Vaudry D, do Rego J C, Liénard F, Pénicaud L, Fioramonti X, Ebenezer I S, Hökfelt T, Déchelotte P, Fetissov S O. Gut Commensal E. coli Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth[J]. *Cell metabolism*, 2016, 23(2):324-334.
- [28] Wahlström A, Sayin S I, Marschall H U, Bäckhed F. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism[J]. *Cell metabolism*, 2016, 24(1):41-50.
- [29] Pistollato F, Sumalla Cano S, Elio I, Masias Vergara M, Giampieri F, Battino M. Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease[J]. *Nutrition reviews*, 2016, 74(10):624-634.
- [30] Larsen N, Vogensen F K, van den Berg F W, Nielsen D S, Andreasen A S, Pedersen B K, Al-Soud W A, Sørensen S J, Hansen L H, Jakobsen M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults[J]. *PloS one*, 2010, 5(2):e9085.
- [31] Keshavarzian A, Green S J, Engen P A, Voigt R M, Naqib A, Forsyth C B, Mutlu E, Shannon K M. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease[J]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2015, 30(10):1351-1360.
- [32] O'Callaghan A, van Sinderen D. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota[J]. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7:925.
- [33] Arbolea S, Watkins C, Stanton C, Ross R P. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging[J]. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7:1204.
- [34] Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikkila J, Monti D, Satokari R, Franceschi C, Brigidi P, De Vos W. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians[J]. *PloS one*, 2010, 5(5):e10667.
- [35] O'Sullivan O, Coakley M, Lakshminarayanan B, Conde S, Claesson M J, Cusack S, Fitzgerald A P, O'Toole P W, Stanton C, Ross R P. Alterations in intestinal microbiota of elderly Irish subjects post-antibiotic therapy[J]. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2013, 68(1):214-221.
- [36] Silva A R, Santos A C, Farfel J M, Grinberg L T, Ferretti R E, Campos A H, Cunha I W, Begnami M D, Rocha R M, Carraro D M, de Bragança Pereira C A, Jacob-Filho W, Brentani H. Repair of oxidative DNA damage, cell-cycle regulation and neuronal death may influence the clinical manifestation of Alzheimer's disease[J]. *PloS one*, 2014, 9(6):e99897.

- [37] Kannaiyan R, Mahadevan D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy[J]. Expert review of anticancer therapy, 2018, 18(12):1249-1270.
- [38] McLaurin J, Franklin T, Chakrabarty A, Fraser P E. Phosphatidylinositol and inositol involvement in Alzheimer amyloid-beta fibril growth and arrest[J]. Journal of molecular biology, 1998, 278(1):183-194.
- 375 [39] Braakman I, Bulleid N J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum[J]. Annual review of biochemistry, 2011, 80:71-99.
- [40] Pajak B, Kania E, Orzechowski A. Killing Me Softly: Connotations to Unfolded Protein Response and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease[J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2016, 2016:1805304.
- 380 [41] Xiang C, Wang Y, Zhang H, Han F. The role of endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disease[J]. Apoptosis : an international journal on programmed cell death, 2017, 22(1):1-26.