

跑台运动对帕金森病模型大鼠肠道菌群结构及多样性的影响

马欣然¹, 刘欣昊¹, 李宇佳¹, 罗开亮², 马书杰³, 胡军^{1,3}<https://doi.org/10.12307/2024.223>

投稿日期: 2023-01-19

采用日期: 2023-03-13

修回日期: 2023-04-26

在线日期: 2023-05-23

中图分类号:

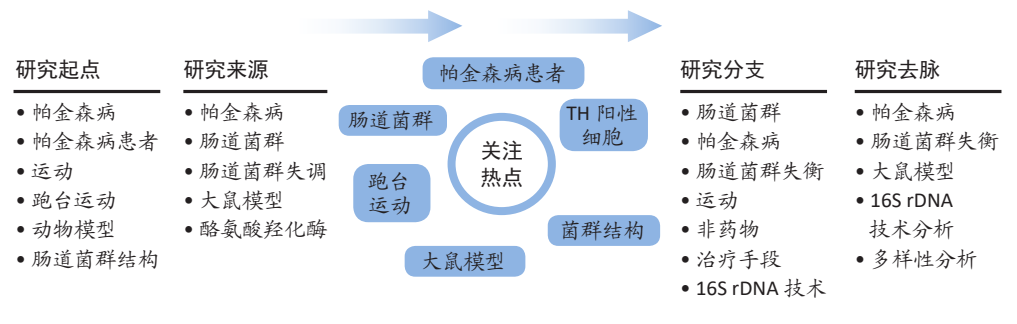
R446; R318; R496

文章编号:

2095-4344(2024)14-02227-07

文献标识码: B

文章快速阅读: 跑台运动干预帕金森病模型大鼠肠道菌群的结构及多样性



文题释义:

16S rDNA: 是细菌分类学研究中最常用的“分子钟”, 其序列包含9个可变区(Variable region)和10个保守区(Constant region)。可变区因细菌而异, 且变异程度与细菌的系统发育密切相关。通过检测16S rDNA的序列变异和丰度, 可以了解环境样品中群落多样性信息。基于16S rDNA的分析在微生物分类鉴定、微生态研究等方面起到重要作用。

肠道菌群: 是存在于人体肠道内的所有微生物的统称, 对宿主免疫系统有重要意义。可能通过促进神经炎症反应、干扰神经递质、紊乱宿主免疫反应及影响微生物-肠-脑轴等, 加速帕金森病的发生发展。跑台运动对于帕金森病所导致的肠道微生物失衡具有显著调节作用, 可缓解与菌群相关的疾病症状。

摘要

背景: 运动对于肠道菌群失调具有调节作用, 能有效保护有益菌群, 改善肠道环境; 但跑台运动对帕金森病肠道微生物群落结构及多样性的影响及具体作用机制尚不明确。

目的: 利用16S rDNA技术分析跑台运动对帕金森病模型大鼠肠道菌群群落结构及多样性的影响, 并探讨非药物跑台运动改善帕金森病的作用机制。

方法: 18只SD大鼠随机选取12只, 利用单侧黑质2点法脑注射6-羟基多巴胺诱导建立帕金森病大鼠模型; 剩余6只为假手术组, 采用相同定位及注射方式注射同等剂量含0.2%抗坏血酸的生理盐水。造模成功的12只帕金森病模型大鼠随机分为帕金森病模型组和跑台运动组, 每组6只。跑台运动组进行中低强度跑台运动干预(10 m/min, 30 min/d, 5 d/周), 连续干预4周。在最后1次跑台运动结束后24 h取大鼠新鲜粪便并置于液氮冻存, 采用16S rDNA测序技术分析大鼠粪便菌群结构的变化。

结果与结论: ①跑台运动可明显改善帕金森病模型大鼠的行为学及黑质酪氨酸羟化酶阳性细胞表达, 缓解由帕金森病引起的肠道微生物群落结构及多样性的变化, 增加大鼠操作分类单位(OTUs)数量, 调节Alpha及Beta多样性; ②在肠道菌群门和属水平, 帕金森病模型组中Firmicutes(厚壁菌门)/Bacteroidetes(拟杆菌门)丰度比值较假手术组减少, 而Prevotella(普雷沃氏菌属)、Bacteroides(拟杆菌属)、Clostridium_XIV(梭菌属)等有益菌经跑台运动后有明显上升; ③结果提示: 跑台运动对于帕金森病所导致的行为学异常、多巴胺能神经元的毒性损伤及肠道微生物失衡具有显著调节作用, 可缓解与菌群相关的疾病症状, 对帕金森病改善具有积极作用。

关键词: 跑台运动; 帕金森病; 肠道菌群; 16S rDNA; 大鼠

Effect of treadmill exercise on the structure and diversity of intestinal microflora in rats with Parkinson's disease

Ma Xinran¹, Liu Xinhao¹, Li Yujia¹, Luo Kailiang², Ma Shujie³, Hu Jun^{1,3}

¹School of Rehabilitation Science, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; ²Department of Rehabilitation, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China; ³The Second Rehabilitation Hospital of Shanghai, Shanghai 200441, China

Ma Xinran, Master candidate, School of Rehabilitation Science, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Corresponding author: Hu Jun, MD, Chief physician, Associate professor, School of Rehabilitation Science, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; The Second Rehabilitation Hospital of Shanghai, Shanghai 200441, China

¹上海中医药大学康复医学院, 上海市 201203; ²福建医科大学附属第一医院康复医学科, 福建省福州市 350005; ³上海市第二康复医院, 上海市 200441

第一作者: 马欣然, 女, 1998年生, 浙江省余姚市人, 汉族, 在读硕士, 主要从事老年病与运动系统疾病的康复研究。

通讯作者: 胡军, 博士, 主任医师, 副教授, 上海中医药大学康复医学院, 上海市 201203; 上海市第二康复医院, 上海市 200441

<https://orcid.org/0000-0002-0985-1261> (马欣然)

基金资助: 国家自然科学基金青年基金项目(81603713), 项目负责人: 马书杰; 上海市卫生健康委员会科研基金项目(202040485),

项目负责人: 胡军; 上海市宝山区科学技术基金项目(20-E-43), 项目负责人: 马书杰

引用本文: 马欣然, 刘欣昊, 李宇佳, 罗开亮, 马书杰, 胡军. 跑台运动对帕金森病模型大鼠肠道菌群结构及多样性的影响 [J].

中国组织工程研究, 2024, 28(14):2227-2233.



Abstract

BACKGROUND: Exercise has a regulatory effect on intestinal flora dysbiosis, which can effectively protect the beneficial flora and improve the intestinal environment. However, the effect of treadmill exercise on the structure and diversity of intestinal microbial community in Parkinson's disease and the specific mechanism are not clear.

OBJECTIVE: Using 16S rDNA technique to analyze the effect of treadmill exercise on the structure and diversity of the intestinal flora of rats with Parkinson's disease, and to investigate the mechanism of non-pharmacological treadmill exercise to improve Parkinson's disease.

METHODS: Twelve of the 18 Sprague-Dawley rats were randomly selected to make animal models of Parkinson's disease using unilateral 2-point nigrostriatal injection of 6-hydroxydopamine. The remaining six rats were used as sham-operation group, which were injected with the same dose of saline containing 0.2% ascorbic acid using the same positioning and injection method. After successful modeling, 12 rats with Parkinson's disease were randomly divided into model group and treadmill exercise group ($n=6$ per group). The treadmill exercise group was subjected to a middle and low intensity treadmill exercise, 10 m/min, 30 minutes per day, 5 days per week for 4 weeks. Fresh feces were collected and stored in liquid nitrogen 24 hour after the last exercise session, and the changes in fecal flora were analyzed by 16S rDNA sequencing technique.

RESULTS AND CONCLUSION: Treadmill exercise significantly improved behavior and nigrostriatal tyrosine hydroxylase-positive cell expression in rats with Parkinson's disease model and alleviated changes in the structure and diversity of the gut microbial community caused by Parkinson's disease, increased the number of operational taxonomic units and modulated Alpha and Beta diversity in rats. At the phylum and genus levels, the abundance ratio of Firmicutes/Bacteroidetes in the model group decreased compared with the sham-operated group, while beneficial bacteria such as *Prevotella*, *Bacteroides*, and *Clostridium_XIV* increased significantly after treadmill exercise. To conclude, treadmill exercise has a significant modulating effect on behavioral abnormalities, toxic damage to dopaminergic neurons and gut microbial imbalance caused by Parkinson's disease, alleviates the symptoms of flora-related diseases, and has a positive effect on the improvement of Parkinson's disease.

Key words: treadmill exercise; Parkinson's disease; intestinal flora; 16S rDNA; rat

Funding: National Natural Science Foundation of China (Youth Project), No. 81603713 (to MSJ); Scientific Research Fund Project of Shanghai Municipal Health Commission, No. 202040485 (to HJ); Shanghai Baoshan District Science and Technology Fund Project, No. 20-E-43 (to MSJ)

How to cite this article: MA XR, LIU XH, LI YJ, LUO KL, MA SJ, HU J. Effect of treadmill exercise on the structure and diversity of intestinal microflora in rats with Parkinson's disease. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(14):2227-2233.

0 引言 Introduction

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 作为全球第二大神经退行性疾病, 常见于 60 岁以上人群, 且随年龄增长发病率升高^[1]。数据显示, 中国现有 PD 患者超过 300 万, 每年约有 10 万新发病例。PD 的临床诊断以运动症状为主, 非运动症状为辅^[2]。由于 PD 患病初期就诊率低、误诊率高, 且确切病因及发病机制尚不明确, 治疗效果欠佳, 所造成的家庭、社会经济负担不断增加。目前, 药物与非药物疗法已被大量运用于 PD 的康复治疗中, 尽管产生了一定的疗效, 但也只能做到延缓症状的发生, 无法做到根治, 且药物治疗的疗效会随时间而降低, 而长期服药带来的毒副作用可能加速疾病的发展, 因此寻找更对症的治疗方法至关重要^[3-5]。肠道菌群是存在于人体肠道内的所有微生物的统称, 对宿主免疫系统有重要意义。机体内环境稳定时, 肠道菌群维持着动态平衡并与中枢神经系统进行双向调节; 当机体内环境紊乱时, 肠道菌群失调, 并可能通过促进神经炎症反应、干扰神经递质、紊乱宿主免疫反应及影响微生物-肠-脑轴等对神经系统产生负面影响, 减缓治疗的进程甚至加速神经系统的退化^[6-10]。

近几年, 运动训练作为一种重要的非药物治疗方法被广泛用于 PD 患者的康复治疗中。研究表明, 运动对于肠道菌群失调具有调节作用, 能有效保护有益菌群, 改善肠道环境^[11]。中低强度的跑台运动具有改善肠道功能、增强机体免疫力、抗肿瘤、抗衰老、减轻 PD 模型大鼠黑质-纹状体多巴胺能神经元的退变及降低 α -突触核蛋白的表达水平等作用, 并能促进厚壁菌门和双歧杆菌等有益菌群的发展^[12-13]。由此可见, 跑台运动在干预 PD 的进展中拥有重要价值。因此, 该研究基于 Illumina Hiseq 测序平台的 16S rDNA 技术, 从肠道菌群角度研究跑台运动对 PD 肠道微生物群落结构及多样性的影响, 进而探讨跑台运动改善 PD 病理症状的可能作用机制, 为其在临床诊断与治疗中应用提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组对照, 多组间比较采用单因素方差分析, 组内差异采用 LSD-t 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 7-10 月在上海中医药大学动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 18 只, 6-8 周龄, 体质量 160-200 g, 由上海中医药大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2018-0006。饲养环境: 动物房温度 (23±2) °C, 相对湿度 60%-65%。空气洁净度 7 级, 交替进行 12 h 光照、12 h 黑暗处理, 6 只/笼, 正常饮食。

该实验方案经上海中医药大学动物实验中心伦理委员会批准 (审批号: PZSHUTCM201204004)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 主要试剂 异氟烷 (深圳瑞沃德生命科技有限公司, 批号: R510-22); 6-羟基多巴胺 (批号: MKCJ2199)、抗坏血酸 (批号: WXBD2611V)、阿扑吗啡 (批号: LRAC4767) 均购自美国 Sigma 公司; 柠檬酸 (pH6.0) 抗原修复液 (批号: G1202)、PBS (批号: G0002)、BSA (批号: G5001)、酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 一抗 (批号: GB11181)、HRP-山羊抗兔二抗 (批号: GB23303) 均购自 Servicebio 公司; 试剂盒 DAB 显色剂 (DAKO, 批号: K5007)。

1.3.3 主要仪器 小动物跑步机 (上海欣软信息科技有限公司, 型号: XR-PT-10B); 增强型小动物麻醉机 (型号: R540)、大鼠脑立体定位仪 (型号: 68018) 均购自深圳瑞沃德生命科技有限公司; 微量进样器 (上海高鸿工贸有限公司, 规格: 5 μ L); 小动物颅骨钻 (深圳赛德克斯医疗科技有限公司, 型号: 78001); 涡旋混合器 (Servicebio, 型号: MX-F); 包埋机 (武汉俊杰电子有限公司, 型号: JB-P5); 病理切片机 (上

海徕卡仪器有限公司, 型号: RM2016)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组 将造模成功的 12 只 PD 大鼠, 随机分为 PD 模型组 ($n=6$) 和跑台运动组 ($n=6$), 另纳入只注射抗坏血酸的 6 只大鼠为假手术组。

1.4.2 动物模型制备 采用右侧黑质 2 点法注射 6-羟基多巴胺诱导建立 PD 大鼠模型^[14-15]。异氟烷气体麻醉大鼠并固定于脑立体定位仪上, 暴露颅骨, 确定 2 个定位点 (第 1 定位点: 前囟后 5.2 mm, 中线右侧 1.0 mm, 硬膜下 9 mm; 第 2 定位点: 前囟后 5.2 mm, 中线右侧 1.5 mm, 硬膜下 8.5 mm) 并标记。轻缓钻透颅骨, 用微量注射器抽取质量浓度为 2 g/L 的 6-羟基多巴胺溶液 (使用含 0.2% 抗坏血酸溶液配制), 每定位点注射 3 μ L, 进针速度 1 mm/min, 注射速度 1 μ L/min, 留针时间 5 min, 退针速度 1 mm/min, 所有操作完成后缝合皮肤。假手术组采用相同定位及注射方式, 注射同等剂量含 0.2% 抗坏血酸的生理盐水。模型制备手术后第 7 天, 通过腹腔注射 0.5 mg/kg 阿扑吗啡 (apomorphine, APO), 诱导其进行旋转测试判定 PD 模型大鼠的制备情况 (记录 30 min 内平均旋转圈数 > 7 次/min 表明模型合格)^[16]。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	探究跑台运动对帕金森病模型大鼠肠道菌群群落结构及多样性的影响
动物选择的条件	SPF 级 SD 雄性大鼠, 6-8 周龄, 体质量 160-200 g
模型与所研究疾病的关系	6-羟基多巴胺诱导建立帕金森病大鼠模型, 可模拟人发生帕金森病的病理过程, 表现与帕金森病类似, 可用于该病的防治研究
动物来源及品系	SD 大鼠由上海中医药大学实验动物中心提供
造模技术描述	采用右侧黑质 2 点法, 脑注射 6-羟基多巴胺诱导建立帕金森病大鼠模型。异氟烷气体麻醉大鼠并固定于脑立体定位仪上, 暴露颅骨, 确定 2 个定位点 (第 1 定位点: 前囟后 5.2 mm, 中线右侧 1.0 mm, 硬膜下 9 mm; 第 2 定位点: 前囟后 5.2 mm, 中线右侧 1.5 mm, 硬膜下 8.5 mm) 并标记。轻缓钻透颅骨, 用微量注射器抽取浓度为 2 μ g/ μ L 的 6-羟基多巴胺溶液 (使用含 0.2% 抗坏血酸溶液配制), 每定位点注射 3 μ L。进针速度 1 mm/min, 注射速度 1 μ L/min, 留针时间 5 min, 退针速度 1 mm/min, 操作完成后缝合皮肤
造模主要诱导用药	6-羟基多巴胺
动物数量及分组方法	造模成功的 12 只帕金森病大鼠随机分为帕金森病模型组 ($n=6$) 和跑台运动组 ($n=6$), 另纳入只注射抗坏血酸的 6 只大鼠为假手术组
造模成功评价指标	手术后第 7 天, 大鼠腹腔注射 0.5 mg/kg 阿扑吗啡, 诱导其进行旋转测试, 30 min 内, 平均旋转圈数 > 7 次/min 表明模型合格
造模后动物处理	最后 1 次跑台运动结束后 24 h, 取大鼠新鲜粪便并置于液氮冻存, 异氟烷气体麻醉大鼠, 灌注, 取脑
造模后实验观察指标	①旋转测试指标; ②爬杆实验指标; ③脑黑质 TH 阳性细胞结果; ④肠道菌群的操作分类单位 (operational taxonomic units, OTUs) 分析; ⑤肠道菌群的 Alpha 多样性分析、分类学组成分析、Beta 多样性分析及群落结构分析
伦理委员会批准	实验方案经上海中医药大学动物实验中心伦理委员会批准 (审批号: PZSHUTCM201204004)

1.4.3 跑台运动干预方案 第 1 次旋转测试后, 进行中低强度跑台运动干预。训练方案为: 10 m/min, 30 min/d, 5 d/周 (周六、日休息), 持续 4 周。假手术组和 PD 模型组正常饲养, 不进行跑台干预。

1.4.4 旋转测试 在跑台运动干预前、干预第 10, 20 天 3 个时间点, 用阿扑吗啡诱导 PD 模型组和跑台运动组的 2 组大鼠进行对侧旋转测试。

1.4.5 爬杆实验 在跑台运动后第 3, 10, 15, 20 天, 通过爬杆实验考察 3 组大鼠运动及肢体协调能力。将长 50 cm、直径 1 cm 的金属杆底端固定, 并将塑料小球固定于顶端, 为保证杆表面粗糙防止打滑, 将杆身缠绕纱布。将大鼠头向下置于杆顶, 同时双后肢置于球上, 自然爬下的同时开始计时。当双前肢接触底端时, 结束计时。实验前让大鼠先行适应性训练。

1.4.6 肠道样本采集 在最后 1 次跑台运动结束后 24 h, 待动物排便后立即将新鲜粪便装入离心管中, 放入 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存。

1.4.7 TH 阳性细胞免疫组化检测 在最后 1 次跑台运动结束后 24 h, 各组取 3 只大鼠进行异氟烷气体麻醉, 灌注, 取脑黑质切片, 置于柠檬酸抗原修复缓冲液 (pH 6.0) 中进行抗原修复, PBS 洗 3 次, 5 min/次; 切片放入体积分数 3% 过氧化氢溶液, 室温避光孵育 25 min, PBS 洗 3 次, 5 min/次; 3%BSA 均匀覆盖组织, 室温封闭 30 min; 甩掉封闭液, 滴加按比例配好的一抗 (1 : 500), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBS 冲洗后滴加二抗 (1 : 200), 室温孵育 50 min; PBS 冲洗后滴加 DAB 溶液, 显微镜下显色, 自来水冲洗切片终止显色; 苏木精复染, 自来水洗返蓝, 脱水透明, 中性树脂胶封固; 镜下观察, 图像采集。

1.4.8 16S rDNA 基因扩增 提取样本 DNA, 并放入 -80 $^{\circ}$ C 低温保存, 干冰条件下运输寄送至检测机构 (深圳华大基因股份有限公司)。取质量合格的基因组 DNA 样品 30 ng 及对应的融合引物配置 PCR 反应体系, 选择 V3-V4 区扩增。引物 341F: ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG, 806R: GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT。使用 Agencourt AMPure XP 磁珠对 PCR 扩增产物进行纯化并溶于 Elution Buffer, 贴上标签, 完成建库。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对文库的片段范围及浓度进行检测。检测合格的文库根据插入片段大小, 选择 HiSeq 平台进行测序。

1.4.9 生物信息学数据分析 下机数据经过数据过滤, 滤除低质量的 reads, 剩余高质量的 Clean data 方可用于后期分析; 通过 reads 之间的 Overlap 关系将 reads 拼接成 Tags; 在给定的相似度下 (通常按照 97% 为标准) 将 Tags 聚成操作分类单位 (operational taxonomic units, OTUs), 然后通过 OTU 与数据库比对, 对 OTU 进行物种注释; 基于 OTU 和物种注释结果进行样品物种复杂度分析以及组间物种差异分析等, 主要包括肠道菌群的 Alpha 多样性分析、分类学组成分析、Beta 多样性分析及群落结构数据 PLS-DA 分析 (Partial least squares discriminant analysis)。

1.5 主要观察指标 ①大鼠旋转测试指标; ②爬杆实验指标; ③脑黑质 TH 阳性细胞; ④肠道菌群的 OTU 分析; ⑤肠道菌群的 Alpha 多样性分析; ⑥肠道菌群的分类学组成分析; ⑦肠道菌群的 Beta 多样性分析; ⑧肠道菌群群落结构分析。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 24.0 统计软件对各组样本数据进行处理, 若计量资料服从正态分布, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组内差异采用 LSD-t 检验。若资料不符合正态分布, 采用 Kruskal-Wallis 检验。 $P < 0.05$ 时认为差异有显著性意义。该文章的统计学方法已经上海中医药大学大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 选取造模成功的 12 只 PD 模型大鼠和只注射抗坏血酸的 6 只正常大鼠用于实验和分析。

2.2 大鼠旋转测试结果 开始干预前, 即模型制备术后第 7 天, PD 模型组大鼠 30 min 旋转圈数为 (364.65±11.33) r, 跑台运动组大鼠 30 min 旋转圈数为 (355.83±21.24) r, 两组未见明显差异。干预第 10 及 20 天, 与 PD 模型组同期相比, 跑台运动组大鼠旋转圈数显著下降 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 | 各组大鼠治疗前后 30 min 旋转圈数变化 ($\bar{x} \pm s, n=6, r$)
Table 1 | Changes in the number of rotational turns within 30 minutes before and after treatment in each group

组别	干预前	第 10 天	第 20 天
PD 模型组	364.65±11.33	354.83±20.23	339.17±25.72
跑台运动组	355.83±21.24	309.67±12.24 ^a	228.33±20.27 ^a

表注: 与 PD 模型组相比, ^a $P < 0.01$ 。PD 为帕金森病

2.3 大鼠爬杆实验结果 在跑台运动干预第 3 天时, 3 组间的爬杆时间未产生明显差异。跑台运动的第 10, 15, 20 天, 与假手术组相比, PD 模型组爬杆时间分别增加了 90.1%, 78.8% 和 91.5%, 两组间比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$); 与 PD 模型组相比, 跑台运动组爬杆时间分别减少 23.3%, 21.7% 和 24.6%, 两组间比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 | 各组大鼠爬杆时间变化 ($\bar{x} \pm s, n=6, s$)
Table 2 | Changes in pole-climbing time in each group

组别	第 3 天	第 10 天	第 15 天	第 20 天
假手术组	7.34±0.34	7.23±0.42	7.12±0.26	6.46±0.32
PD 模型组	8.23±0.43	13.78±0.54 ^a	12.73±0.43 ^a	12.37±0.41 ^a
跑台运动组	7.86±0.46	10.57±0.58 ^b	9.97±0.35 ^b	9.33±0.36 ^b

表注: 与假手术组相比, ^a $P < 0.01$; 与 PD 模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。PD 为帕金森病

2.4 大鼠黑质致密部 TH 阳性细胞检测结果 假手术组可见密集 TH 阳性细胞, 呈棕褐色。与假手术组相比, PD 模型组可见少量、稀疏 TH 阳性细胞, 且 TH 表达较假手术组明显下降 ($P < 0.01$)。经过跑台运动干预后, TH 阳性细胞数量及强度表达明显升高, 与 PD 模型组和假手术组差异均有显著性意义 ($P < 0.01$), 见图 1A, B。

2.5 大鼠样本肠道菌群的 OTU 分析 假手术组共有 805 个 OTUs, 独有 142 个 OTUs; PD 模型组共有 689 个 OTUs, 独有 26 个 OTUs; 跑台运动组共有 736 个 OTUs, 独有 49 个 OTUs; 3 组共有的 OTUs 为 545 个, 见图 2A。进一步分析, 发现 PD 模型组 OTUs 的相对丰度低于假手术组, 而跑台运动组大鼠的 OTUs 相对丰度则显示高于 PD 模型组, 见图 2B。结果表明跑台运动干预后, 可回调 PD 模型组大鼠各分类水平上的 OTUs 丰富度。

2.6 大鼠样本肠道菌群的 Alpha 多样性分析 随着测序深度的增加及数据量的扩大, 局域均匀生境下的物种丰富度也随之改变, 见图 3, 表 3。与假手术组相比, PD 模型组的 Chao 指数有所降低 ($P < 0.05$), Ace 指数及 Sobs 指数均显著降低 ($P < 0.01$); 经跑台运动干预后, 可回调 PD 模型组的 Chao 指数、Ace 指数及 Sobs 指数, 虽然无显著性差异, 但仍可发现跑台运动对由 PD 引起的肠道菌群丰富度及多样性的变化具有一定程度改善作用。

表 3 | 大鼠样本肠道菌群 Alpha 多样性分析 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 | Alpha diversity analysis of intestinal flora in rats

组别	Chao 指数	Ace 指数	Sobs 指数
假手术组	607.9±31.1	602.0±23.5	540.0±24.9
PD 模型组	568.1±21.4 ^a	561.5±20.5 ^b	488.0±23.1 ^b
跑台运动组	573.1±51.0	571.2±47.5	502.5±37.2

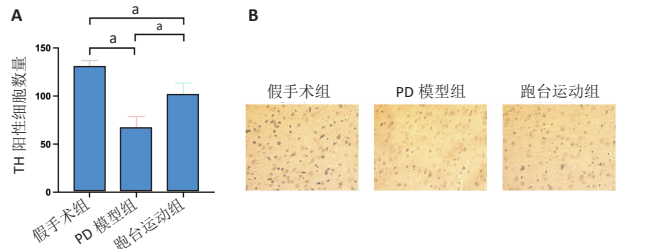
表注: 与假手术组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。PD 为帕金森病

2.7 大鼠样本肠道菌群的分类学组成分析 在门水平, 样本菌群中相对丰度最高的前 4 种菌群分别为 Bacteroidetes (拟杆菌门)、Firmicutes (厚壁菌门)、Verrucomicrobia (疣微菌门) 和 Proteobacteria (变形菌门), 四者比例之和在各组中均达 97% 以上。值得关注的是, 与假手术组相比, PD 模型组中 Tenericutes (无壁菌门) 的丰度水平由 0.016 2% 升高为 0.071 3%, Actinobacteria (放线菌门) 的丰度水平由 0.259 6% 显著降低至 0.097 1%; Candidatus_Saccharibacteria 的丰度水平由 0.492 6% 显著降低至 0.239 3%; 经跑台运动干预后, Tenericutes 的丰度水平升高至 0.268 7%, Actinobacteria 和 Candidatus_Saccharibacteria 的丰度分别降低至 0.030 6% 和 0.099 3%。进一步对肠道菌群进行属水平分析, 发现与 PD 模型组的优势菌群相比, 跑台运动组的 Barnesiella、Ruminococcus、Lactobacillus、Romboutsia 均有所降低, 而有益菌 Prevotella、Bacteroides、Clostridium_XIVa 等呈上升趋势, 见图 4, 5 和表 4, 5。

表 4 | 大鼠样本肠道菌群门水平 Top10 物种组成 (%)
Table 4 | Composition of top 10 species at the phylum level of intestinal flora in rats

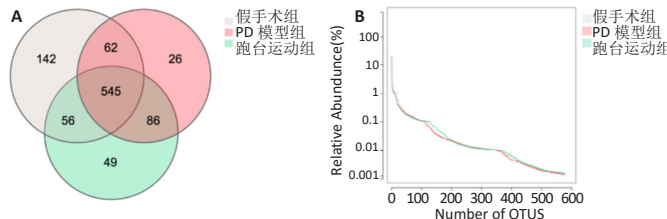
物种	假手术组	帕金森病模型组	跑台运动组	P 值
Bacteroidetes	38.518	60.980	63.729	0.062
Firmicutes	50.871	35.336	33.265	0.060
Verrucomicrobia	8.297	1.191	0.466	0.120
Proteobacteria	0.964	1.717	1.946	0.070
Candidatus_Saccharibacteria	0.493	0.239	0.099	0.004
Actinobacteria	0.260	0.097	0.031	0.001
Tenericutes	0.016	0.071	0.269	0.001
Spirochaetes	0.203	0.000	0.000	0.120
Deferribacteres	0.016	0.001	0.004	0.219
Synergistetes	0.000	0.003	0.001	0.290

2.8 大鼠样本肠道菌群的 Beta 多样性分析 采用 Beta 多样性热图和基于 UniFrac 距离的样本聚类分析, 考察样本微生物群落结构间的差异和相似性。结果显示假手术组与 PD 模型组间样本明显分开, 说明造模对群落的结构产生了一定影响; 同时跑台运动组与假手术组的组间区域相接近, 与 PD 模型组区域相距较远, 说明跑台运动对 PD 模型的肠道菌群结构具有回调作用, 见图 6A, B。



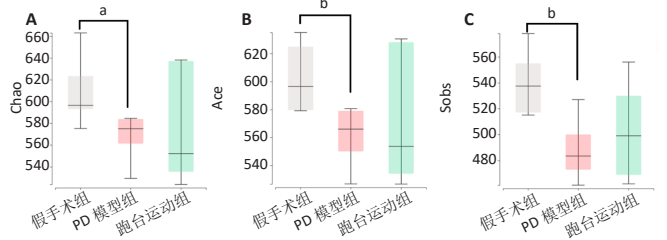
图注：图 A 为脑黑质 TH 阳性细胞计数，^a $P < 0.01$ ；B 为免疫组化观察 TH 阳性细胞表达 ($\times 75$)。PD：帕金森病。TH：酪氨酸羟化酶

图 1 | 各组大鼠脑黑质致密部 TH 阳性细胞免疫组化结果
Figure 1 | Immunohistochemical results of tyrosine hydroxylase-positive cells in the substantia nigra



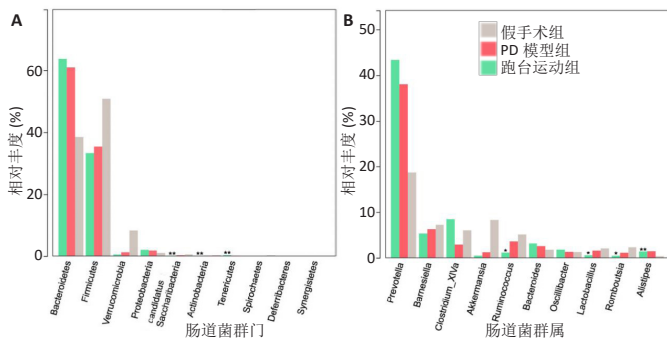
图注：图 A 为大鼠的 Venn 图分析；B 为大鼠的 OTU Rank 曲线。PD：帕金森病

图 2 | 各组大鼠样本肠道菌群的操作分类单位 (OTU) 分析
Figure 2 | Operational taxonomic unit analysis of intestinal flora in rats from each group



图注：图 A 为肠道菌群 Chao 指数；B 为肠道菌群 Ace 指数；C 为肠道菌群 Sobs 指数。^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。PD：帕金森病

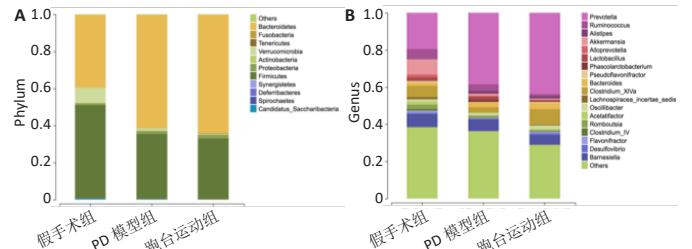
图 3 | 各组大鼠样本肠道菌群 Alpha 多样性分析
Figure 3 | Alpha diversity analysis of intestinal flora in rats from each group



图注：图 A 为肠道菌群门水平相对丰度比较；B 为肠道菌群属水平相对丰度比较。PD：帕金森病

图 4 | 各组大鼠样本肠道菌群的分类学组成分析
Figure 4 | Taxonomic composition analysis of intestinal flora in rats from each group

2.9 大鼠样本肠道菌群群落结构分析 基于主成分分析和将多元回归的功能相结合，对群落结构数据进行 PLS-DA 分析，见图 7。假手术组、PD 模型组及跑台运动组 3 组各自类聚，其中假手术组与 PD 模型组无交集，说明造模后样本微生物群落发生明显变化。跑台运动组与假手术组虽无交集，但较 PD 模型组间的距离更近，说明跑台运动对 PD 模型组菌群有一定的回调作用。

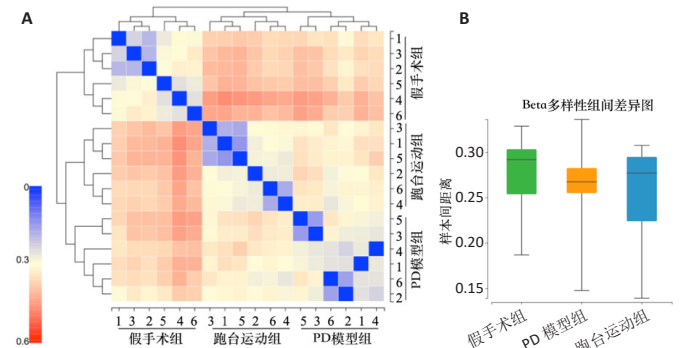


图注：图 A 为肠道菌群门水平物种组成柱形图分析；B 为肠道菌群属水平物种组成柱形图分析。PD：帕金森病

图 5 | 各组大鼠样本肠道菌群物种组成柱形图分析
Figure 5 | Histogram analysis of species composition of intestinal flora in rats from each group

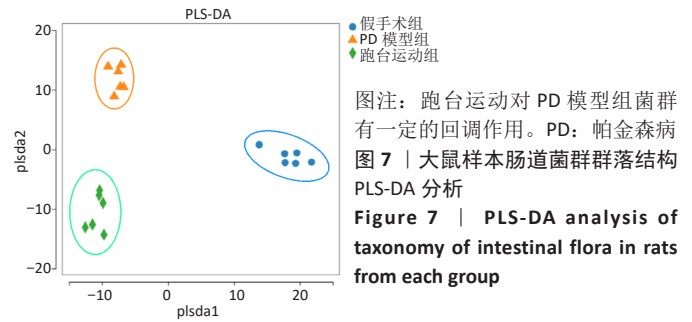
表 5 | 大鼠样本肠道菌群属水平 Top10 物种组成
Table 5 | Composition of top 10 species at the genus level of intestinal flora in rats

物种	假手术组	帕金森病模型组	跑台运动组	P 值
<i>Prevotella</i>	18.684	38.100	43.316	0.135
<i>Barnesiella</i>	7.249	6.299	5.351	0.366
<i>Clostridium_XIVa</i>	6.038	2.951	8.468	0.082
<i>Akkermansia</i>	8.297	1.191	0.466	0.120
<i>Ruminococcus</i>	5.147	3.643	1.125	0.015
<i>Bacteroides</i>	1.837	2.622	3.207	0.220
<i>Oscillibacter</i>	1.234	1.277	1.857	0.652
<i>Lactobacillus</i>	2.119	1.643	0.560	0.018
<i>Romboutsia</i>	2.374	1.081	0.451	0.016
<i>Alistipes</i>	0.331	1.495	1.384	0.004



图注：图 A 为肠道菌群 Beta 多样性热图；B 为肠道菌群 Beta 多样性组间差异

图 6 | 各组大鼠样本肠道菌群的 Beta 多样性分析
Figure 6 | Beta diversity analysis of intestinal flora in rats from each group



图注：跑台运动对 PD 模型组菌群有一定的回调作用。PD：帕金森病

图 7 | 大鼠样本肠道菌群群落结构 PLS-DA 分析
Figure 7 | PLS-DA analysis of taxonomy of intestinal flora in rats from each group

3 讨论 Discussion

PD 是中枢神经系统常见的进行性疾病，由于其发病率不断升高及暂未发现适宜有效的治疗举措，已逐渐成为人们关注与讨论的热点。在医学研究方面，由于缺乏 PD 研究的模型系统，尚不清楚其发生和发展，也暂未有合适方法对 PD 进行有效治疗。当前的医学治疗通常以改善 PD 症状为主要治疗

方式^[17-18]。如在病情初始阶段使用左旋多巴^[19]，配合使用多巴胺激动剂进行治疗^[20]。但已有研究指出3-5年后，左旋多巴的疗效出现减退，并在治疗的5年和15年后，运动并发症的发生率可达到60%甚至更高^[21-22]。

有研究表明，6-羟基多巴胺注射后24 h内即出现黑质多巴胺神经元变性，因大脑纹状体多巴胺系统被破坏，多巴胺受体失神经支配导致敏感性增高，此时应用多巴胺受体激动剂，如阿扑吗啡，可使大脑侧兴奋作用占优产生侧旋旋转，以此对PD症状进行量化，此方法也是判断6-羟基多巴胺诱导PD模型是否成功的金标准^[23]。因此，课题组在干预前、干预第10、20天利用阿扑吗啡诱导大鼠旋转，以30 min内大鼠平均旋转圈数>7次/min为造模成功指标。结果表明，造模后大鼠转圈数增加明显，PD模型组在4周后，旋转圈数依然符合标准，说明使用单侧黑质2点法脑注射6-羟基多巴胺诱导建立PD大鼠模型成功且相对稳定。与PD模型组同期相比，跑台运动组旋转圈数在干预第10、20天出现明显下降，说明运动可有效缓解PD模型大鼠多巴胺系统的损毁程度(表1)。结合爬杆实验的结果，与PD模型组同期比较，跑台运动组也在干预后第10天出现了爬杆时间明显缩短，并且效果持续至干预结束，说明运动可一定程度改善PD模型大鼠的行为学表现(表2)。为了进一步明确造模是否成功以及跑台运动对多巴胺能神经元的作用，使用免疫组化法检测了TH阳性神经元的表达情况。黑质TH是多巴胺合成的限速酶，其数量与多巴胺含量有直接关联^[24]。免疫组化结果显示假手术组可见密集、呈棕褐色的TH阳性细胞；与假手术组相比，PD模型组TH阳性细胞数量明显减少，存在多巴胺能神经元的死亡。而经过4周跑台运动的干预，改善了这一趋势，说明早期运动干预能促进多巴胺能神经元的表达，减缓6-羟基多巴胺对大鼠黑质多巴胺能神经元的毒性损伤程度(图1)。

人体肠道菌群结构复杂，数量庞大，参与机体的各类活动^[25]。肠道菌群作为疾病治疗的新靶点与机体健康紧密相关。已有研究表明，肠道菌群失调会影响中枢神经系统，明显增加PD的患病概率^[26]。HOUSER等^[27]于2017年讨论了肠道菌群与PD之间的联系，认为PD起源于肠道，并以炎症为基础机制不断发展。SCHEPERJANS等^[28]发现，PD患者肠道菌群中普氏菌(*Prevotellaceae*)的平均丰度较健康对照组减少了77.6%。除此之外，HILL-BURNS等^[29]在一项纳入了197例PD患者和130位健康人的研究中，发现了PD患者肠道菌群失调的特征，并指出该PD患者的肠道内的*Bifidobacterium*(双歧杆菌)、*Christensenellaceae*(克里斯滕森菌)、*Tissierellaceae*(铁丝菌)、*Lachnospira*(毛螺旋菌)、*Lactobacillaceae*(乳杆菌科)、巴斯德菌科(*Pasteurellaceae*)和*Verrucomicrobiaceae*(疣微菌科)的丰度显著变化。

值得关注的是，运动作为一种非药物干预手段，能够有效调节肠道菌群的分布，提高菌群多样性，促进肠道微生态平衡。越来越多的研究证明，通过运动的方式如转轮、跑台，

游泳等均能对肠道菌群产生不同程度的影响^[30-31]。尽管目前PD致病机制尚未明确，但可以确定PD的发生与肠道菌群失调具有紧密联系。已有证据表明将PD小鼠的粪便秘植给健康小鼠，会导致健康小鼠出现不同程度的运动功能障碍，并且黑质-纹状体多巴胺与5-羟色胺含量下降^[32-33]。在此背景下，此次实验选择了跑台运动作为研究的运动模型来探讨对PD的潜在价值，采用16s rDNA技术对各组大鼠的肠道微生物多样性进行研究，将获得的OTUs信息、Alpha多样性、Bate多样性等对样本进行分析，从肠道菌群层面分析跑台运动对PD的治疗效果。

首先，此次实验结果证实了运动可改变大鼠肠道菌群的丰度及比例。当肠道微生物丰度及多样性减少时，会使肠道黏膜向炎症状态转变，产生的炎症因子可能通过肠-脑轴对大脑产生影响从而导致PD的发生发展^[34]。跑台运动组大鼠的菌群丰富度(OTUs)较PD模型组升高(图2)，并且在Alpha多样性分析中，Chao、Ace和Sobs指数都是反映菌群物种丰富度的重要指标。PD模型组大鼠肠道菌群丰度显著下降，通过跑台运动可一定程度改善由PD引起的肠道菌群丰富度及比例失调(图3)。在门水平下占主要比例的Bacteroidetes(拟杆菌门)、Firmicutes(厚壁菌门)、Verrucomicrobia(疣微菌门)与Proteobacteria(变形菌门)均发生显著性变化。如，PD模型组中Firmicutes/Bacteroidetes丰度比值较假手术组减少(图4A，图5A，表4)，表明肠道环境已经发生明显改变，且该比值升高很可能与认知障碍改善存在关联^[35]。有意思的是，进一步分析发现在属水平下，*Prevotella*(普雷沃氏菌属)、*Bacteroides*(拟杆菌属)、*Clostridium_XIV*(梭菌属)等有益菌经跑台运动后有明显上升(图4B，图5B，表5)。*Bacteroides*产生的γ-氨基丁酸是基底神经节-丘脑-皮质环路中的重要神经递质，PD患者的γ-氨基丁酸表达均明显降低，进而影响了直接回路和间接回路的兴奋-抑制平衡^[36-37]。因此，保护基底神经节γ-氨基丁酸能神经元对防治PD具有重要作用^[38]。与此同时，有研究指出*Prevotella*丰度的升高可以提高黑质-纹状体中多巴胺含量，改善肠道通透性，而肠道通透性与α-突触核蛋白聚集、氧化应激等也有显著相关性^[39]；*Clostridium_XIV*可产生具有抗炎作用的丁酸盐，其可以促进血脑屏障功能恢复，并可显著改善认知功能。运动干预使此类有益菌群上升，通过抑制炎症反应等避免多巴胺神经元凋亡，缓解PD相关症状^[40-41]。以上结果提示，微生物-肠-脑轴很可能是PD发生发展的潜在机制，而通过早期中低强度的运动干预，可有效调节肠道菌群及其代谢物，并由血液运输至脑内从而间接地对中枢神经系统产生影响，一定程度改善PD病理症状。另一方面，运动也可能通过抑制炎症因子表达、降低氧化应激水平等直接影响中枢神经系统，缓解多巴胺能神经元的毒性损伤，从而间接改善肠道菌群环境。

此外，此次实验从样本微生物群落结构间的差异和相似性的结果中发现，假手术组与PD模型组间样本明显分开(图6A)，说明PD造模对肠道菌群的群落结构产生了一定影响。

值得一提的是, 经过对跑台运动组大鼠的肠道菌群进行分析和比较, 发现跑台运动后其与假手术组的组间区域相接近, 而与 PD 模型组区域相距较远, 说明跑台运动对 PD 模型的肠道菌群结构具有明显改善作用 (图 6)。除此, 对群落结构数据进行 PLS-DA 分析, 也发现了类似规律, 即 3 组各自聚类, 其中跑台运动组对 PD 模型组菌群有一定的回调作用 (图 7)。

综上所述, 跑台运动作为非药物和无创的治疗手段, 在改善 PD 行为学异常、促进多巴胺能神经元的表达、调节肠道菌群结构组成及机体肠道微环境的稳态等方面具有积极的作用和独特的意义。此次研究通过 16s rDNA 测序技术证实了跑台运动可明显改善 PD 模型的肠道菌群结构和丰度, 改善的菌群涉及对 PD 患者具有重要调节作用的神经递质 γ -氨基丁酸、黑质-纹状体多巴胺功能和肠道免疫炎症反应等。虽然肠道菌群失调与 PD 之间是如何进行双向环路调节的机制尚有待探究, 但研究已证明跑台运动可通过调控肠道菌群为 PD 防治提供新策略。后期作者将扩大样本量, 并针对运动训练的持续时间、运动强度进行更深入系统的研究, 弥补此次实验存在的局限。

作者贡献: 马欣然负责实验实施和论文撰写, 资料收集为刘欣昊、李宇佳、罗开亮, 实验指导为马书杰, 论文审校为胡军。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] 梁建庆. 帕金森病的发病机制、诊断标准及治疗策略 [J]. 解放军医学杂志, 2018,43(8):631-635.
- [2] 张贺, 姜立刚. 帕金森病非运动症状研究现状 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2021,24(1):72-76.
- [3] 陈芝君, 马建, 唐娜, 等. 中国帕金森病疾病负担变化趋势分析及预测 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2022,30(9):649-654.
- [4] PD MED Collaborative Group. Long-term effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase B inhibitors compared with levodopa as initial treatment for Parkinson's disease (PD MED): a large, open-label, pragmatic randomised trial. *Lancet*. 2014;384(9949):1196-205.
- [5] 王宽, 詹彦, 蒋理, 等. 丘脑核脑深部电刺激治疗伴有异动的帕金森病的疗效分析 [J]. 第三军医大学学报, 2020,42(24):2426-2432.
- [6] SCHMIDT TSB, RAES J, BORK P. The human gut microbiome: from association to modulation. *Cell*. 2018;172:1198-1215.
- [7] 马艺鑫, 隋国媛, 韩阳. 基于阴阳失衡探讨肠道菌群失调与亚健康状态的关系 [J]. 辽宁中医杂志, 2020,47(3):104-105.
- [8] 邹媛媛, 郑钦日, 徐君铭. 肠道菌群与神经性疾病的进展 [J]. 临床医学进展, 2022,12(1):6.
- [9] SKJAERBAEK C, KNUDSEN K, HORSAGER J, et al. Gastrointestinal Dysfunction in Parkinson's Disease. *J Clin Med*. 2021;10(3):493.
- [10] ZHU Y, YUAN M, LIU Y, et al. Association between inflammatory bowel diseases and Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis. *Neural Regen Res*. 2022;17(2):344-353.
- [11] 余锋, 贾芳芳, 徐帅, 等. 运动介导肠道微生物-肠-脑轴调控神经功能的机制 [J]. 上海体育学院学报, 2021,45(1):66-77.
- [12] MOTIANI KK, COLLADO MC, ESKELINEN JJ, et al. Exercise Training Modulates Gut Microbiota Profile and Improves Endotoxemia. *Med Sci Sports Exerc*. 2020;52(1):94-104.

- [13] CROWLEY EK, NOLAN YM, SULLIVAN AM. Exercise as a therapeutic intervention for motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease: Evidence from rodent models. *Prog Neurobiol*. 2019;172:2-22.
- [14] UNGERSTEDT U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 1968;5(1):107-110.
- [15] 王利, 何建成. 复方地黄颗粒对帕金森病大鼠细胞凋亡的干预作用 [J]. 中华中医药杂志, 2020,35(8):4122-4125.
- [16] CARMAN LS, GAGE FH, SHULTS CW. Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. *Brain Res*. 1991;553(2):275-283.
- [17] WANG W, LV Z, GAO J, et al. Treadmill exercise alleviates neuronal damage by suppressing NLRP3 inflammasome and microglial activation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res Bull*. 2021;174:349-358.
- [18] ISLAM MS, AZIM F, SAJU H, et al. Pesticides and Parkinson's disease: Current and future perspective. *J Chem Neuroanat*. 2021;115:101966.
- [19] ARMSTRONG MJ, OKUN MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA*. 2020;323(6):548-560.
- [20] 李胜德, 王琳, 关鸿志, 等. 脑积水-腹腔分流术后帕金森综合征三例临床分析 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2017,17(2):127-132.
- [21] TURCANO P, MIELKE MM, BOWER JH, et al. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease: A population-based cohort study. *Neurology*. 2018;91(24):e2238-e2243.
- [22] PRANGE S, DANAILA T, LAURENCIN C, et al. Age and time course of long-term motor and nonmotor complications in Parkinson disease. *Neurology*. 2019;92(2):e148-e160.
- [23] 王孟迪, 张秋梅, 范蓓, 等. 基于文献数据库的 6-OHDA 帕金森病大鼠模型特点分析及在中药研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023,33(1):93-102.
- [24] MINAEI A, SAROOKHANI MR, HAGHDOOST YH, et al. Hydrogen sulfide attenuates induction and prevents progress of the 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rat through activation of ATP-sensitive potassium channels and suppression of ER stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2021;15(423):115558.
- [25] 华嵘暄, 高略, 王博雅, 等. 菌-肠-脑轴与血脑屏障通透性的相关性研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2022,30(2):100-108.
- [26] YEMULA N, NJOKU P, TAKYI J. The second brain in Parkinson's disease: fact or fantasy? *Neural Regen Res*. 2022;17(8):1737-1738.
- [27] HOUSER MC, TANSEY MG. The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? *NPJ Parkinsons Dis*. 2017;3(1):3.
- [28] SCHEPERJANS F, AHO V, PEREIRA PA, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord*. 2015;30(3):350-358.
- [29] HILL-BURNS EM, DEBELIUS JW, MORTON JT, et al. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Mov Disord*. 2017;32(5):739-749.
- [30] 宋刚, 廖帅雄. 运动与肠道菌群研究综述 [J]. 中国体育科技, 2019,55(10):56-61.
- [31] 廖沁, 曾来生, 陈杨, 等. 基于 16S rRNA 测序分析游泳运动对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 江西医药, 2022,57(5):437-443.
- [32] 张博桦, 申延琴. 肠道菌群与帕金森病的研究进展 [J]. 延安大学学报 (医学科学版), 2021,19(1):80-86.
- [33] SUN MF, ZHU YL, ZHOU ZL, et al. Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: Gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF- α signaling pathway. *Brain Behav Immun*. 2018;70:48-60.
- [34] PEREZ-PARDO P, DODIYA HB, ENGEN PA, et al. Role of TLR4 in the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice. *Gut*. 2019;68(5):829-843.
- [35] 刘蓉, 梁春光, 王德良, 等. 基于高通量测序分析黄酒对 D-半乳糖致衰老小鼠模型肠道微生物菌群的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2020,46(2):32-39.
- [36] STRANDWITZ P, KIM KH, TEREKHOVA D, et al. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nat Microbiol*. 2019;4(3):396-403.
- [37] OTARU N, YE K, MUJEZINOVIC D, et al. GABA Production by Human Intestinal Bacteroides spp.: Prevalence, Regulation, and Role in Acid Stress Tolerance. *Front Microbiol*. 2021;12:656895.
- [38] 李雪, 孟庆雄. 肠道微生物对寿命的影响及其机制 [J]. 中国生物工程杂志, 2022,42(4):49-57.
- [39] 卢芳, 闫静思, 张冶, 等. 基于 16S rRNA 基因测序技术研究刺五加对帕金森病模型大鼠肠道菌群结构及多样性的影响 [J]. 药物生物技术, 2021,28(6):551-560.
- [40] HAYASHI A, NAGAO-KITAMOTO H, KITAMOTO S, et al. The Butyrate-Producing Bacterium *Clostridium butyricum* Suppresses *Clostridioides difficile* Infection via Neutrophil- and Antimicrobial Cytokine-Dependent but GPR43/109a-Independent Mechanisms. *J Immunol*. 2021;206(7):1576-1585.
- [41] GASALY N, HERMOSO MA, GOTTELAND M. Butyrate and the Fine-Tuning of Colonic Homeostasis: Implication for Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):3061.

(责任编辑: WZH, ZN, WL, LCH)