

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.20.002

肠道菌群通过 NLRP3 介导神经炎症调节 rmTBI 导致的记忆功能障碍*

汪家文¹, 李佳洁^{1,2}, 吴君¹, 吴文鑫¹, 杨林¹

(1. 贵州医科大学法医学院/法医司法鉴定中心, 贵阳, 550004; 2. 贵州医科大学
生物与工程学院/健康医药现代产业学院, 贵阳 550004)

[摘要] **目的** 探讨肠道菌群通过海马核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3(NLRP3)介导神经炎症调节重复轻度创伤性脑损伤(rmTBI)导致的记忆功能障碍的机制。**方法** 建立 rmTBI 大鼠模型,将大鼠分为对照组(con)组,rmTBI 组,rmTBI+生理盐水灌胃(rmTBI+saline)组,rmTBI+粪便溶液灌胃粪菌移植(rmTBI+FMT)组 4 组。Morris 水迷宫实验(MWM)检测不同组别大鼠神经记忆功能,干湿法检测大鼠脑水肿程度,16SrRNA 检测大鼠肠道菌群种类及丰度,ELISA 法及免疫组织化学法(IHC)检测 NLRP3、caspase-1、白细胞介素(IL)-18、IL-1 β 表达情况。**结果** 在 MWM 中,rmTBI 大鼠潜伏期明显增加($P < 0.001$)、穿越平台次数明显减少($P < 0.01$),经 FMT 治疗后,潜伏期明显减少($P < 0.05$),穿越平台次数明显增加($P < 0.01$)。脑含水量和苏木素-伊红(HE)染色结果显示,rmTBI 后大鼠脑水肿明显。IHC 结果显示:rmTBI 后胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、离子钙接头蛋白 1(Iba-1)表达水平明显升高($P < 0.05$),FMT 后降低($P < 0.05$)。与 rmTBI 组及 rmTBI+saline 组相比,FMT 后,大鼠血清 NLRP3、caspase-1、IL-18 表达水平均明显降低($P < 0.05$);与 rmTBI 组相比,FMT 干预后大鼠血清 IL-1 β 表达水平明显降低($P < 0.001$)。从结构分析来看 16S rRNA 检测结果,FMT 后,在门水平上,拟杆菌门、变形菌门丰度均减少;在属水平上,乳杆菌属丰度增加。肠道菌群失调与神经炎症、记忆功能障碍相关性分析显示三者具有相关性。**结论** rmTBI 后大鼠肠道菌群失调,引起大鼠空间记忆功能减弱,而 FMT 通过调节炎症通路能改善 rmTBI 大鼠记忆功能。

[关键词] 创伤性脑损伤;记忆功能障碍;肠道菌群;NLRP3;神经炎症

[中图分类号] R651.1+5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2023)20-3048-07

The intestinal flora regulating memory dysfunction caused by rmTBI through NLRP3 mediating neuroinflammation*

WANG Jiawen¹, LI Jiajie^{1,2}, WU Jun¹, WU Wenxin¹, YANG Lin¹

(1. School of Forensic Medicine/Forensic Judicial Appraisal Center, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. School of Biology and Engineering/School of Health Medicine Modern Industry, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism by which the gut microbiota mediates neuroinflammation and regulates memory impairment caused by repeated mild traumatic brain injury (rmTBI) through NLRP3. **Methods** Mild rmTBI rat models were established, and the rats were divided into four groups: the control (con) group, the rmTBI group, the rmTBI+saline group, and the rmTBI+fecal solution gavage fecal microbiota transplantation (rmTBI+FMT) group. Morris water maze experiment (MWM) was used to detect the neural memory function of different groups of rats, dry and wet weighing method was used to detect the degree of brain edema in rats, 16SrRNA was used to detect the types and abundance of gut microbiota in rats, ELISA and immunohistochemistry staining (IHC) were used to detect NLRP3, caspase-1, interleukin (IL)-18, IL-1 β expression. **Results** In MWM, the latency of rmTBI rats was significantly increased ($P < 0.001$), and the number of crossing platforms was significantly decreased ($P < 0.01$). After FMT treatment, the latency was significantly decreased ($P < 0.05$), while the number of crossing platforms was significantly increased ($P < 0.01$). The brain water content and HE staining results showed significant brain edema in rats after rmTBI. IHC results showed that the expression levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) were significantly increased after rmTBI ($P < 0.05$), but were dec-

reased after FMT ($P < 0.05$). Compared with rats in the rmTBI group and rmTBI+saline group, the serum expression levels of NLRP3, caspase-1, and IL-18 were significantly reduced after FMT ($P < 0.05$). Compared with the rmTBI group, serum expression level of IL-1 β in rats after FMT intervention significantly decreased ($P < 0.001$). From a structural analysis perspective, at the phylum level, both Bacteroidetes and Proteobacteria were decreased. At the genus level, Lactobacillus genus was improved. The correlation analysis among intestinal microbiota imbalance, neuroinflammation and memory impairment showed a correlation. **Conclusion** After rmTBI, the intestinal microbiota of rats is disordered, which can cause a decrease in spatial memory function, while FMT can improve memory function in rmTBI rats by regulating the inflammatory pathway.

[Key words] traumatic brain injury; memory dysfunction; intestinal flora; NLRP3; neuroinflammation

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 已成为全球公共卫生问题, 据统计全球每年约有 1 000 万人受 TBI 影响^[1]。TBI 是长期残疾及多种慢性神经性疾病如帕金森病、脑卒中、记忆功能损伤、抑郁和神经退行性疾病的主要原因之一^[2-4]。中、重度 TBI 患者一般能得到及时救助, 而轻度 TBI 患者由于器质性变化不明显而延误治疗, 进而面临着重复损伤的风险, 即重复轻度创伤性脑损伤 (rmTBI)^[5-7]。胃肠道是微生物最多的器官, 10 万亿~100 万亿的微生物生活在结肠中^[8]。已有研究表明, 帕金森病、脑卒中、记忆功能损伤和抑郁都与肠道菌群有关, TBI 发生后肠道菌群结构也发生改变^[9-10]。而 rmTBI 发生后肠道菌群如何变化, 少见报道。

急性 TBI 可引起肠道菌群失调, 24 h 内可导致加塞乳杆菌、黄色瘤胃球菌和腹真杆菌数量明显减少, 而沟真杆菌和福玛马文布兰菌数量明显增加^[11]。TBI 后缺血性脑卒中也会导致严重的肠道菌群失调, 且与脑损伤的程度和预后有关^[12-14]。肠道菌群有助于恢复核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLRP3) 介导的神经炎症和慢性乙醇暴露 (CEE) 诱导的抑郁样行为, 肠道菌群失调也可以导致小鼠脑组织小胶质细胞活化和神经炎症反应, 从而加剧脑损伤^[15-16]。恢复肠道菌群失调, 有望给 TBI 带来治疗效果。

脑-肠-微生物轴三者之间相互作用的改变在许多疾病的发生、发展中扮演着重要角色^[17]。rmTBI 常常伴随着炎症的发生, 例如 rmTBI 发生后, NLRP3 炎症小体可被激活, 从而激活 caspase-1, 形成活化的炎性体。caspase-1 进一步剪切白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 和 IL-18 前体, 形成其成熟体, 并通过消皮素 D (gasdermin-D, GSDMD)-N 介导的质膜孔释放, 从而诱导 NLRP3 炎症细胞焦亡^[18-19]。肠道菌群可通过脑-肠-微生物轴来调节神经炎症, 而肠道微生物移植能有效地缓解炎症反应从而改善神经功能障碍^[20-25]。

粪菌移植 (fecal microbiota transplantation, FMT) 是一种通过把正常粪便中的细菌混合物转移到患者肠道中而引入新的菌群的方法, 该法可使脊髓损伤和缺血性脑卒中后的肠道菌群失调正常化, 从而发挥保护神经的作用^[13, 26-27]。FMT 还可通过使 TBI 后肠道菌群正常化从而达到缓解神经功能缺损的作用^[28]。FMT 能否

使 rmTBI 后肠道菌群正常化而改善 rmTBI 导致的神经功能障碍, 尚不清楚。本研究拟通过建立 rmTBI 大鼠模型, 研究大鼠 rmTBI 后肠道菌群失调与其神经功能障碍的关系, 以及 FMT 是否能通过调节 NLRP3/caspase-1/IL-18 炎症通路来恢复这种失调, 影响神经功能效力, 从而缓解 rmTBI 后肠道菌群紊乱、神经炎症、神经功能障碍而发挥治疗作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6 周龄 SD 雄性大鼠购自长沙天勤生物技术有限公司。动物操作程序按照动物保护和使用委员会的规定进行, 并经贵州医科大学动物中心批准 (批准号: NJMU-1807003)。实验开始前 1 周, 所有大鼠均于光暗循环新环境适应性喂养, 大鼠自由获得食物和水。然后随机将大鼠分为 4 组: 对照 (control, con) 组, rmTBI 组, rmTBI+生理盐水灌胃 (rmTBI+saline) 组, rmTBI+粪便溶液灌胃粪菌移植 (rmTBI+FMT) 组。

1.2 方法

1.2.1 rmTBI 模型建立

使用单摆撞击装置构建 rmTBI 模型。32 只大鼠用异氟烷麻醉后将其暴露在单摆撞击装置的平台上进行撞击。每天进行 5 次撞击, 连续进行 5 d。

1.2.2 FMT 治疗

FMT 悬浮液制备: 9:00-11:00 取大鼠新鲜粪便, 置于 -80 °C 冰箱保存。使用前解冻, 以生理盐水稀释为 200 mg/mL 的粪便悬浮液, 并在标准混合器中均化, 置于离心机内 2 000 r/min 离心 10 min, 收集悬浮液用于 FMT。FMT: 每天损伤大鼠 2 h 后对 rmTBI+saline 组、rmTBI+FMT 组大鼠分别进行 200 μ L 生理盐水和粪便悬浮液灌胃, 在 rmTBI 结束后继续灌胃 2 d。

1.2.3 Morris 水迷宫实验

将大鼠轻轻放入直径 1.5 m 的水池当中, 池子分为 4 个象限, 水池里的水没过平台 2 cm, 并与钛白粉混合以隐藏平台, 水温 (25 \pm 3) °C。平台处于第三象限中部, 如果大鼠找到逃逸平台 (潜伏期), 实验结束; 若在 120 s 内未找到平台, 则将大鼠引导到平台上休息 15 s, 每天 3 次。分别从第一象限、第二象限、第四象限放入, 持续 4 d。于第 5 d 撤去平台, 随机选一个

象限将大鼠轻轻放入水池中,记录大鼠 60 s 内的运动路径、距离、在目标象限停留的时间、穿越平台的次数及时间;若 60 s 内未找到平台,则潜伏期记为 60 s。

1.2.4 组织处理

各组大鼠用戊巴比妥钠麻醉。然后灌注磷酸盐缓冲液(PBS)和 4%多聚甲醛溶液,仔细解剖、分离大鼠脑组织。部分大鼠脑组织进行脑含水量检测,其余浸泡于 4%多聚甲醛溶液固定 1 周。取海马腹侧组织,石蜡包埋、切片并进行免疫组织化学染色(IHC)及苏木素-伊红(HE)染色。

1.2.5 脑水肿程度测定

使用干湿法测定大鼠脑水肿程度。使用 10%水合氯醛麻醉,经心灌注生理盐水后处死大鼠,取出脑组织,沿正中中线切开,分离出左右半球,立即称重。然后放入 100 °C 烤箱中 48 h 烤干,再迅速称量脑组织干重。计算脑含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.2.6 HE 染色

切片经 70 °C 烤 1 h,依次在二甲苯 I、二甲苯 II、100%→80%→60%梯度乙醇脱蜡水合后滴加苏木素染核,1%盐酸酒精分化,稀氨水返蓝后滴加 1%伊红染色液,经自来水冲洗后脱水透明,中性树胶封片。

1.2.7 ELISA 法检测 NLRP3、caspase-1、IL-18、IL-1 β 表达水平

取大鼠外周血血清,分别从 NLRP3、caspase-1、IL-18、IL-1 β 试剂盒中取出板条,分为标准品孔、0 值孔、样品孔和空白孔,分别在标准品孔、0 值孔和样品孔中加入不同浓度的标准品,样品稀释液各 50 μ L,辣根过氧化物酶(HRP)100 μ L,空白孔不加,封板膜封口,恒温避光孵育 1 h。弃去板内液体,吸水纸拍干,洗涤液洗涤后向所有孔中加入底物混合液 100 μ L,恒温箱避光孵育 15 min,加入反应终止液 50 μ L,酶标仪上 450 nm 处测所有孔的吸光度值(A 值)。

1.2.8 IHC 法检测大鼠海马区胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、离子钙接头蛋白 1(Iba-1)表达水平

切片经 70 °C 烤 1 h,用二甲苯 I、二甲苯 II、100%→80%→60%梯度乙醇脱蜡水合后用 3% H₂O₂ 孵育,去除内源性过氧化物酶,然后置于乙二胺四乙酸(EDTA)抗原修复液中进行高压修复。滴加山羊血清封闭液,在 37 °C 培养箱中孵育 30 min,然后加入各种靶蛋白的一抗,在 4 °C 下孵育过夜。一抗包括 GFAP(GTX108711,1:500 稀释,美国 Gene Tex 公司)和 Iba-1(GTX100042,1:200 稀释,美国 Gene Tex 公司)。在 PBS 中冲洗 3 次后,滴加山羊抗兔二抗,室温孵育 1 h。PBS 洗 3 次用二氨基联苯胺(DAB)显色液显示信号,用苏木素对细胞核进行双染色,然后在自来水下冲洗 15 min。最终脱水透明后用中性树胶封口。

1.2.9 16S rRNA 测序

使用粪便基因组 DNA 提取试剂盒(TianGen)提

取大鼠粪便 DNA,使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的纯度及浓度。按照常规流程操作方法获得 PCR 扩增产物,使用浓度为 2%的琼脂糖凝胶电泳检测,对合格的 PCR 产物进行磁珠纯化,通过酶标定量法根据 PCR 产物的浓度进行等量混样,充分混匀后再使用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测。使用通用型 DNA 纯化回收试剂盒(TianGen)回收目的条带产物。使用 NEB Next[®] Ultra[™] II FS DNA PCR-free Library Prep Kit(New England Biolabs)构建文库,对构建好的文库进行 Qubit 和实时荧光定量 PCR(qPCR)定量,待文库检测合格后,使用 NovaSeq 6000 进行 PE250 上机测序。

1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS26.0(R 软件,Version 2.15.3)统计软件进行分析。采用正态分布方差齐性检验,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;若不服从正态分布,以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,采用非参数秩和检验(Wilcoxon 和 Mann-Whitney *U* 检验)比较组内和组间差异。计数资料采用频数和率(构成比)表示,采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法比较组间差异。通过 GraphPad Prism9.0.1 绘制统计分析图。相关性分析采用 Pearson 相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rmTBI 后大鼠记忆功能障碍及 FMT 的治疗作用

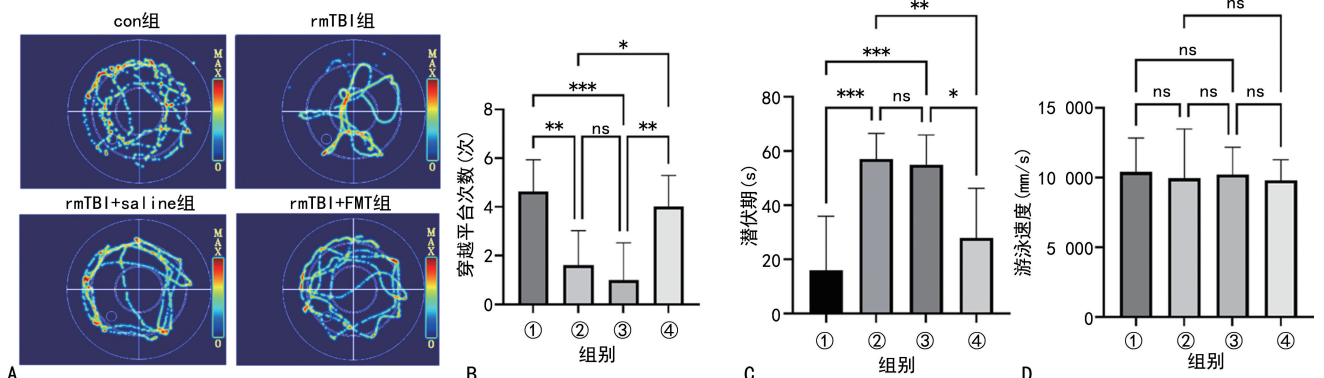
大鼠的水迷宫踪迹见图 1A。结果显示,rmTBI 可引起记忆功能障碍,表现为:大鼠穿越平台的次数明显减少($P < 0.01$,图 1B),潜伏期明显增长($P < 0.001$,图 1C);使用 FMT 干预后,大鼠的记忆功能得到了恢复(图 1B、C)。4 组大鼠的游泳速度差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1D),排除了大鼠因为游泳能力不同导致空间记忆功能差异的可能性。

2.2 FMT 改善 rmTBI 后脑水肿程度

con 组、rmTBI 组、rmTBI+saline 组、rmTBI+FMT 组脑含水量分别为 77.3%±0.9%、80.3%±1.2%、81.9%±1.5%、76.4%±2.1%,rmTBI 组和 rmTBI+saline 组差异无统计学意义($P > 0.05$),相比于 con 组明显增多($P < 0.05$);与 rmTBI 组和 rmTBI+saline 组相比,rmTBI+FMT 组大鼠脑含水量明显减少($P < 0.05$)。

2.3 组织病理学改变

病理学结果显示:与 con 组相比,rmTBI 组、rmTBI+saline 组、rmTBI+FMT 组大鼠大脑海马区神经细胞及脑血管周隙明显增宽;与 rmTBI 组、rmTBI+saline 组相比,经 FMT 治疗后大鼠海马区神经细胞及脑血管周隙明显减小,脑水肿程度明显减轻,见图 2。



A: 代表性大鼠踪迹图; B: 大鼠穿越平台次数组间比较; C: 大鼠第 1 次找到平台时间(潜伏期)组间比较; D: 大鼠游泳速度组间比较; ①: con 组; ②: rmTBI 组; ③: rmTBI+saline 组; ④: rmTBI+FMT 组; * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$; ns : $P > 0.05$ 。

图 1 Morris 水迷宫实验检测大鼠空间记忆功能

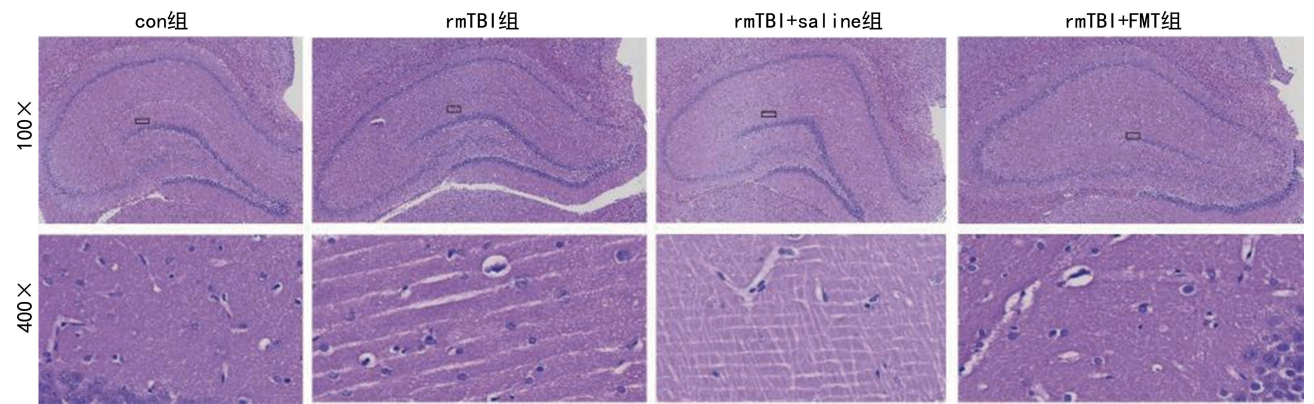
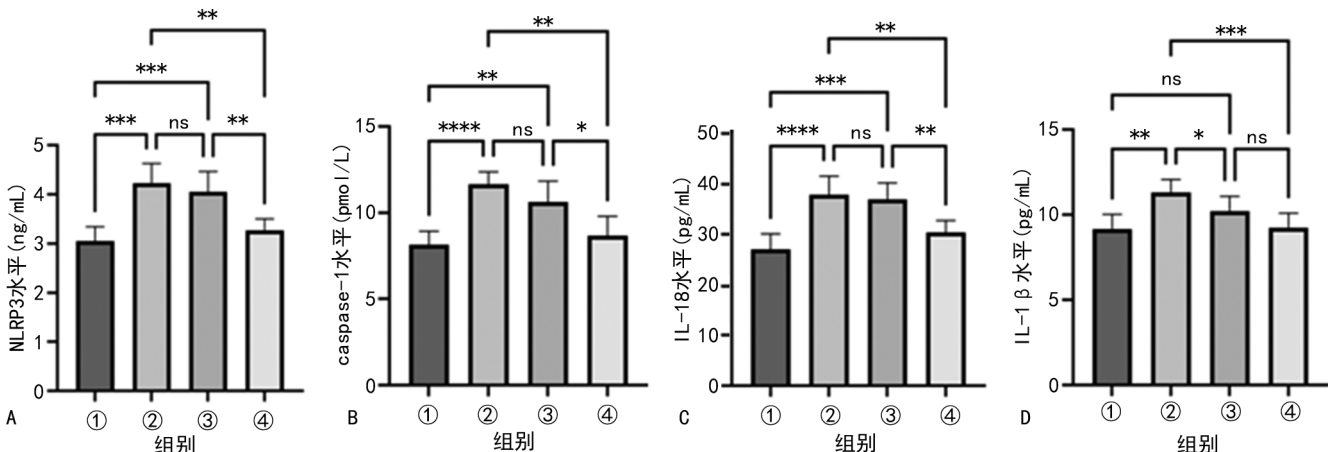


图 2 海马区病理学改变(HE 染色)

2.4 ELISA 法检测大鼠血清中 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 、IL-18 表达

血清学结果显示:与 con 组相比,rmTBI 组及 rmTBI+saline 组大鼠血清 NLRP3、caspase-1、IL-18 表达水平均明显升高($P < 0.01$),rmTBI 组大鼠血清 IL-1 β 表达水平明显升高($P < 0.01$)。rmTBI 组和 rmTBI+saline 组大鼠组间血清 NLRP3、caspase-1、IL-18 表达水平

差异均无统计学意义($P > 0.05$),IL-1 β 表达水平较 rmTBI 组明显降低($P < 0.05$)。与 rmTBI 组及 rmTBI+saline 组相比,经 FMT 干预治疗后,大鼠血清 NLRP3、caspase-1、IL-18 表达水平均明显降低($P < 0.05$)。与 rmTBI 组相比,FMT 干预后大鼠血清 IL-1 β 表达水平明显降低($P < 0.001$),与 rmTBI+saline 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

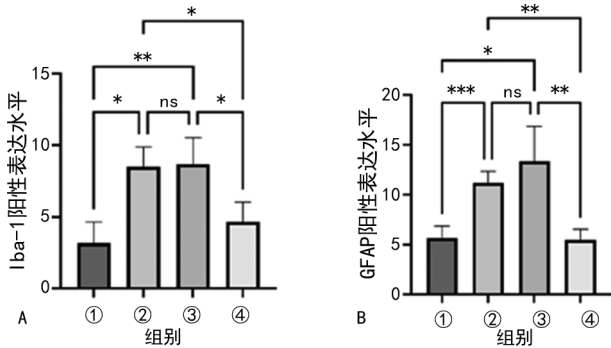


A: 大鼠血清 NLRP3 水平组间比较; B: 大鼠血清 caspase-1 水平组间比较; C: 大鼠血清 IL-18 水平组间比较; D: 大鼠血清 IL-1 β 水平组间比较; ①: con 组; ②: rmTBI 组; ③: rmTBI+saline 组; ④: rmTBI+FMT 组; * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, **** : $P < 0.0001$; ns : $P > 0.05$ 。

图 3 各组大鼠血清中 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 、IL-18 表达水平

2.5 IHC 检测大鼠海马区 GFAP、Iba-1 表达水平

IHC 检测大鼠海马区 GFAP、Iba-1 表达,结果显示:rmTBI 组和 rmTBI + saline 组大鼠海马区 GFAP、Iba-1 表达水平无明显差异($P > 0.05$)。与 con 组相比,rmTBI 组和 rmTBI + saline 组大鼠海马区 GFAP、Iba-1 表达水平明显升高($P < 0.05$)。与 rmTBI 组和 rmTBI + saline 组相比,rmTBI + FMT 组大鼠海马区 GFAP、Iba-1 表达水平明显降低($P < 0.05$),见图 4。



A:随机选取不同标本同一位置 $0.1\text{ mm} \times 0.1\text{ mm}$ 面积内 Iba-1 阳性表达统计分析;C:随机选取不同标本同一位置 $0.1\text{ mm} \times 0.1\text{ mm}$ 面积内 GFAP 阳性表达统计分析;①: con 组;②: rmTBI 组;③: rmTBI + saline 组;④: rmTBI + FMT 组;*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$;ns: $P > 0.05$ 。

图 4 各组大鼠海马区 GFAP、Iba-1 表达水平

2.6 门分类水平丰度分布

根据物种注释结果,在门水平上选取排名前 10 的门从高到低分别是:厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteriota)、绿弯菌门(Chloroflexi)、放线菌门(Actinobacteriota)、脱硫杆菌门(Desulfobacterota)、疣微菌门(Verrucomicrobiota)、弯曲杆菌门(Campilobacterota)、黏菌门(Myxococcota)。其中厚壁菌门、

拟杆菌门均大量存在于各个样品中,所占比例高,是构成肠道菌群的优势菌门。除此之外,各个样品的菌门所占比例也不相同。例如 rmTBI 组样品 4 中厚壁菌门相对丰度高达 67%;con 组样品 3 中拟杆菌门相对丰度高达 58%。

2.7 属分类水平丰度分布

在属分类水平上,丰度排名前 10 的菌属依次是:乳酸菌属(Muribaculaceae)、乳杆菌属(Lactobacillus)、普氏菌属(Prevotella)、毛螺球菌科-NK4A136 属(Lachnospiraceae-NK4A136-group)、普雷沃菌科-Ga6A1 属(Prevotellaceae-Ga6A1-group)、理研菌科-RC9 属(Rikenellaceae-RC9-gut-group)、罗姆布茨菌属(Romboutsia)、拟杆菌属(Bacteroides)、梭状芽胞杆菌-UCG-014 属(Clostridia-UCG-014)、瘤胃菌属(NK4A214-group)。每个样品间菌属构成比例差异较大。例如:con 组样品 2 中 Muribaculaceae 属相对丰度为 45%;con 组样品 5 中 Muribaculaceae 属相对丰度为 23%,Muribaculaceae 属在大鼠个体间差异较大。

2.8 肠道菌群、神经功能障碍、神经炎症相关性分析

肠道菌群、神经功能障碍与神经炎症存在不同的相关性。肠道菌群变化与神经功能障碍、神经炎症具有一定相关性,表现为 Shannon 指数与大鼠潜伏期($r = -0.810$)、GFAP($r = -0.721$)、Iba-1($r = -0.680$)呈负相关,与穿越平台次数呈正相关($r = 0.723$);Simpson 指数与 GFAP 呈负相关($r = -0.628$)。神经功能障碍与神经炎症也具有一定相关性,表现为潜伏期与 GFAP($r = 0.809$)、Iba-1($r = 0.803$)呈正相关,穿越平台次数与 GFAP($r = -0.832$)、Iba-1($r = -0.749$)呈负相关。除此之外,肠道菌群失调与神经功能障碍、神经炎症等多项指标均存在不同的相关性,见表 1。

表 1 Simpson 指数、Shannon 指数、炎症因子、记忆功能障碍指标相关性分析(r)

项目	Simpson 指数	Shannon 指数	潜伏期	跨越平台次数	GFAP	Iba-1	NLRP3
Simpson 指数	1	0.891**	-0.432	0.446	-0.628*	-0.511	0.369
Shannon 指数	0.891**	1	-0.810*	0.723**	-0.721**	-0.680*	0.127
潜伏期	-0.432	-0.810*	1	-0.830**	0.809**	0.803**	0.157
跨越平台次数	0.446	0.723**	-0.830**	1	-0.832**	-0.749**	-0.130
GFAP	-0.628*	-0.721**	0.809**	-0.832**	1	0.852**	-0.065
Iba1	-0.511	-0.680*	0.803**	-0.749**	0.852**	1	0.228
NLRP3	0.369	0.127	0.157	-0.13	-0.065	0.228	1

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

3 讨论

肠道菌群受多因素的影响,包括性别、遗传因素、饮食、年龄、药物和压力等。近年来,TBI 模型已被用于研究肠道微生物组中宿主与微生物之间的相互作用,从而加深对大脑与肠道菌群之间相互调节机制的理解。肠道菌群失调可通过脑-肠-微生物轴影响神经功能,因此神经功能障碍患者更易发生肠道菌群失调,如认知功能障碍、神经免疫功能等神经功能障碍

碍^[29-30]。在 rmTBI 发生后肠道菌群改变,表现为有益菌[如嗜黏蛋白阿克曼菌(Akkermansia)、糖化假丝酵母菌(Candidatus-Saccharimonas)等]减少而有害菌(如 Romboutsia)增多,这种紊乱可导致神经行为改变,进而导致神经功能障碍。

rmTBI 常常伴随着神经炎症反应的发生和神经功能障碍。神经炎症是机体的一种防御反应机制,适当的神经炎症可通过促进组织修复与除去细胞碎片

而对大脑起到保护作用,相反,持续的炎症反应会激活固有免疫细胞,从而导致疾病的发生^[31],进而产生神经功能障碍。研究表明,小胶质细胞、星形胶质细胞、神经元细胞是神经炎症中最重要三类细胞,神经炎症加重了抑郁、阿尔茨海默病、认知功能障碍和神经退行性疾病等神经功能障碍的发生,调节星形胶质细胞-小胶质细胞之间的交互对话可以维持神经元结构和功能的完整性,从而达到维持神经系统内环境的稳定和治疗神经退行性疾病的目的^[32-34]。

脑小胶质细胞、星形胶质细胞的激活受多种因素的影响。Iba-1 是一种钙结合蛋白,可以特异性地结合巨噬细胞和激活的小胶质细胞;GFAP 作为主要的炎症性中枢神经系统疾病标志物,主要存在于成熟的星形胶质细胞内。本研究证实,当 rmTBI 发生后,肠道菌群稳态被破坏,小胶质细胞、星形胶质细胞被激活。肠道菌群失调可间接影响小胶质细胞、星形胶质细胞功能的促炎和抗炎细胞因子循环水平的改变。当肠道菌群的复杂结构受到破坏时,小胶质细胞尤其受到影响。研究表明,神经元和星形胶质细胞合作促进小胶质细胞分支,诱导小胶质细胞特征基因表达^[35]。当神经元所处的微环境稳态被打破时,则会释放出“信号”分子,通过配体-受体的结合,诱导小胶质细胞活化^[36]。

肠道微生物成员的细菌产物或代谢物如三甲胺、短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)是调节小胶质细胞成熟、形态和功能的关键因子^[37-38]。SCFAs 可能通过肠黏膜进入体循环中,进而影响神经系统功能。本研究结果证实,粪便微生物移植可以抑制小胶质细胞、星形胶质细胞的激活,进而减少神经元的焦亡,改善神经功能障碍。然而,肠道菌群影响小胶质细胞、星形胶质细胞激活的机制尚不清楚,推测可能与肠道微生物成员的细菌产物或者代谢物有关,如三甲胺、SCFAs 等。总之,本研究发现肠道菌群的稳态对 rmTBI 后神经炎症和神经功能障碍至关重要,FMT 减少了神经炎症的发生,改善了 rmTBI 后的神经功能障碍,为肠道微生物在大脑损伤后固有免疫系统中的免疫反应提供了证据,有助于理解和治疗 rmTBI 后神经炎症和认知功能损伤、抑郁、空间记忆功能损伤和阿尔茨海默病等神经功能障碍。

rmTBI 可导致肠道菌群失调,表现为肠道菌群丰度增多而多样性下降,有益菌数量减少而致病菌增多,NLRP3/caspase-1/IL-18 炎症通路被激活,同时导致记忆功能损伤;而 FMT 能有效地使失调的肠道菌群正常化,同时调节 NLRP3/caspase-1/IL-18 炎症通路使其表达下调,并对 rmTBI 造成的记忆功能损伤具有恢复作用。

参考文献

[1] VUOKILA N, LUKASIUK K, BOT A M, et al. miR-124-3p is a chronic regulator of gene

expression after brain injury[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(24):4557-4581.

- [2] WILSON L, STEWART W, DAMS-O'CONNOR K, et al. The chronic and evolving neurological consequences of traumatic brain injury[J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(10):813-825.
- [3] LI G, HAN X, GAO L, et al. Association of anxiety and depressive symptoms with memory function following traumatic brain injury[J]. *Eur Neurol*, 2021, 84(5):340-347.
- [4] LALIBERTÉ DURISH C, PEREVERSEFF R S, YE ATES K O, et al. Depression and depressive symptoms in pediatric traumatic brain injury: a scoping review[J]. *J Head Trauma Rehabil*, 2018, 33(3):E18-30.
- [5] GARDNER R C, YAFFE K. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2015, 66(Pt B):75-80.
- [6] CASTILE L, COLLINS C L, MCILVAIN N M, et al. The epidemiology of new versus recurrent sports concussions among high school athletes, 2005-2010[J]. *Br J Sports Med*, 2012, 46(8):603-610.
- [7] GUERRIERO R M, PROCTOR M R, MANNIX R, et al. Epidemiology, trends, assessment and management of sport-related concussion in United States high schools[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2012, 24(6):696-701.
- [8] TURNBAUGH P J, LEY R E, HAMADY M, et al. The human microbiome project[J]. *Nature*, 2007, 449(7164):804-810.
- [9] WANG S, ZHU K, HOU X, et al. The association of traumatic brain injury, gut microbiota and the corresponding metabolites in mice[J]. *Brain Res*, 2021:147450.
- [10] HEISS C N, OLOFSSON L E. The role of the gut microbiota in development, function and disorders of the central nervous system and the enteric nervous system[J]. *J Neuroendocrinol*, 2019, 31(5):e12684.
- [11] TREANGEN T J, WAGNER J, BURNS M P, et al. Traumatic brain injury in mice induces acute bacterial dysbiosis within the fecal microbiome[J]. *Frontiers Immunol*, 2018, 9:2757.
- [12] YANG Z, WEI F, ZHANG B, et al. Cellular immune signal exchange from ischemic stroke to intestinal lesions through brain-gut axis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:688619.
- [13] BENAKIS C, BREA D, CABALLERO S, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells[J]. *Nat Med*, 2016, 22(5):516-523.

- [14] PLUTA R, JANUSZEWSKI S, CZUCZWAR S J. The Role of gut microbiota in an ischemic stroke[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2):915.
- [15] YAO H, ZHANG D, YU H, et al. Gut microbiota regulates chronic ethanol exposure-induced depressive-like behavior through hippocampal NLRP3-mediated neuroinflammation [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28(2):919-930.
- [16] 张叶磊. 健康供体正常菌群移植改变肠道微生物促进创伤性脑损伤小鼠神经功能恢复的研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2022.
- [17] 邓琦蕾, 申元英. 肠道菌群在脑-肠-微生物轴中作用机制的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(14):2404-2407.
- [18] O'BRIEN W T, PHAM L, SYMONS G F, et al. The NLRP3 inflammasome in traumatic brain injury: potential as a biomarker and therapeutic target[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):104.
- [19] LIU H D, LI W, CHEN Z R, et al. Expression of the NLRP3 inflammasome in cerebral cortex after traumatic brain injury in a rat model[J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(10):2072-2083.
- [20] 亓燕. 肠道菌群在动脉粥样硬化易损斑块进展及通心络干预中的作用与机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2022.
- [21] RUTSCH A, KANTSJÖ J B, RONCHI F. The gut-brain axis: how microbiota and host inflammasome influence brain physiology and pathology[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:604179.
- [22] ZHAO Z, NING J, BAO X Q, et al. Fecal microbiota transplantation protects rotenone-induced Parkinson's disease mice via suppressing inflammation mediated by the lipopolysaccharide-TLR4 signaling pathway through the microbiota-gut-brain axis[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1):226.
- [23] 刘保光, 董颖, 谢苗, 等. 基于脑-肠-微生物轴探讨肠道菌群对抑郁症的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(10):6027-6029.
- [24] 刘畅, 李常慧, 王姝元, 等. 基于脑-肠-微生物轴探讨益脾通腑法对帕金森病小鼠的干预机制[J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(10):1320-1327.
- [25] 闫隆, 石江伟, 李虹, 等. 基于脑-肠-微生物轴探讨针刺治疗阿尔茨海默病作用机制的研究概述[J]. *中医杂志*, 2023, 64(2):202-207.
- [26] JING Y, YU Y, BAI F, et al. Effect of fecal microbiota transplantation on neurological restoration in a spinal cord injury mouse model: involvement of brain-gut axis [J]. *Microbiome*, 2021, 9(1):59.
- [27] SINGH V, ROTH S, LLOVERA G, et al. Microbiota dysbiosis controls the neuroinflammatory response after stroke[J]. *J Neurosci*, 2016, 36(28):7428-7440.
- [28] DU D, TANG W, ZHOU C, et al. Fecal microbiota transplantation is a promising method to restore gut microbiota dysbiosis and relieve neurological deficits after traumatic brain injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:5816837.
- [29] YU L W, AGIRMAN G, HSIAO E Y. The gut microbiome as a regulator of the neuroimmune landscape [J]. *Annu Rev Immunol*, 2022, 40:143-167.
- [30] 姜曦, 罗婷, 吴安石. 肠道菌群失调与围手术期神经认知功能障碍的研究进展[J]. *医学综述*, 2021, 27(14):2836-2840.
- [31] KWON H S, KOH S H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes [J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9(1):42.
- [32] 郭壮, 周利君. 星形胶质细胞-小胶质细胞的交互对话在神经炎症中的双重作用[J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(18):2432-2436.
- [33] 李俊杰, 蒋海燕, 白文娅, 等. 沉默 RND3 表达对氧糖缺失/复氧复糖损伤海马神经细胞炎症反应和细胞凋亡的影响[J]. *昆明医科大学学报*, 2021, 42(10):14-21.
- [34] 冯小金. NLRP3 介导的神经炎症在认知功能障碍中的作用及机制研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
- [35] BAXTER P S, DANDO O, EMELIANOVA K, et al. Microglial identity and inflammatory responses are controlled by the combined effects of neurons and astrocytes [J]. *Cell Rep*, 2021, 34(12):108882.
- [36] 程伟能, 张玉琴, 赖文芳, 等. 不同时长氧糖剥夺对大鼠原代皮层神经元-小胶质细胞共培养体系的影响[J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(4):195-200.
- [37] COLOMBO A V, SADLER R K, LLOVERA G, et al. Microbiota-derived short chain fatty acids modulate microglia and promote A β plaque deposition [J]. *Elife*, 2021, 10:e59826.
- [38] MENG F, LI N, LI D, et al. The presence of elevated circulating trimethylamine N-oxide exacerbates postoperative cognitive dysfunction in aged rats [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 368:111902.