

朱华,刘小海,李卓,等. 建立阿尔茨海默症人源肠道菌群动物模型[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 55-62.

Zhu H, Liu XH, Li Z, et al. Establishment of a human flora-associated mouse model correlated with Alzheimer's disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 55-62.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.01.008

建立阿尔茨海默症人源肠道菌群动物模型

朱华¹, 刘小海², 李卓¹, 郭亚茜¹, 杜晓鹏¹, 苏磊¹, 李永宁^{2*}, 秦川^{1*}

(1. 卫健委人类疾病比较医学重点实验室, 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021; 2. 中国医学科学院 北京协和医院, 北京 100730)

【摘要】 目的 使用粪菌移植方法经口途径获得阿尔茨海默症人源肠道菌群(human flora-associated, HFA)模型小鼠,并通过生物信息学、组织病理学等方法对模型进行评价。**方法** 无菌雌性 C57BL/6J 小鼠 28 只,随机分为阿尔茨海默症模型(AD)组和对照(CON)组,分别经口途径接种阿尔茨海默症患者及健康志愿者的新鲜粪便悬液,在移植 6、10 周后每组安乐 7 只动物,取粪便进行 16S rDNA 检测;取脑组织和血液进行 A β 含量、细胞因子检测,脑组织进行组织病理学检查。**结果** CON 组与 AD 组动物体重增长差异无显著性。 α -多样性分析,在建模后两个时间点 AD 组 Simpson 指数升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),ACE($P < 0.05$)和 Chao1($P < 0.05$),Shannon 指数降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),与 CON 组比较差异有显著性。在科水平,AD 组拟杆菌科丰度升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),毛螺菌科($P < 0.001$)、消化链球菌科($P < 0.01$)丰度降低;在属水平,AD 组拟杆菌属丰度升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),梭菌属($P < 0.01$, $P < 0.05$)、毛螺菌属($P < 0.01$, $P < 0.0001$)、寄生菌属($P < 0.01$, $P < 0.001$)丰度降低,与 CON 组比较差异有显著性。 β -多样性分析结果,AD 组、CON 组不同时间点肠型分布在相同区域,不同组别肠型分布在不同区间。2 组动物的肠道菌群在微生物物种构成方面存在显著性差异($P < 0.05$)。AD 组小鼠在建模 10 周时血液和脑中 A β 40 含量升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),与 CON 组比较差异有显著性。与老年斑形成相关的细胞因子检测,IL-1 β 在建模 6 周时浓度降低($P < 0.05$);IL-10 在建模 6 周时升高($P < 0.01$);TGF- β 在建模 10 周时浓度降低($P < 0.01$),与 CON 组比较差异有统计学意义。组织病理学检查未见老年斑生成。**结论** 本研究通过接种患者粪便悬液的方法建立了阿尔茨海默症人源菌群小鼠模型,模型小鼠肠道菌群的结构丰度、与老年斑生成相关细胞因子含量等指标的改变与阿尔茨海默症病人的临床表现类似。

【关键词】 阿尔茨海默症;肠道菌群;无菌小鼠;菌群人源化动物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 01-0055-08

Establishment of a human flora-associated mouse model correlated with Alzheimer's disease

ZHU Hua¹, LIU Xiaohai², LI Zhuo¹, GUO Yaxi¹, DU Xiaopeng¹, SU Lei¹, LI Yongning^{2*}, QIN Chuan^{1*}

(1. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) Comparative Medical Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China.

2. PUMC Hospital, Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100730)

Corresponding author: LI Yongning. E-mail: liyongning@pumc.org; QIN Chuan. E-mail: qinc@cnilas.org

【Abstract】 Objective To establish and evaluate a human flora-associated (HFA) mouse model from patients with Alzheimer's disease (AD) via fecal microbiota transplantation. **Methods** Twenty-eight female germ-free (GF)

【基金项目】 医科院重大协同创新项目(2017-12M-2-005)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Science(2017-12M-2-005)。

【作者简介】 朱华,主任技师,研究方向:病理与病理生理。Email: zhuh@cnilas.org

【通信作者】 秦川,教授,博导,研究方向:人类疾病动物模型。Email: qinc@cnilas.org;

李永宁,主任医师,硕士生导师,研究方向:神经外科。Email: liyongning@pumc.org。

* 共同通信作者

C57BL/6J mice were divided into a healthy control CON group and an AD group. Six-week-old mice were orally inoculated with a 0.4 mL mixed stool suspension from 3 healthy participants CON or 3 AD patients to establish the HFA mouse model. At 6 and 10 weeks post-inoculation, fresh fecal samples were collected and examined for the V3 region of the 16S rDNA gene. Blood sera were collected and examined for A β and cytokine levels. Brain samples were collected, processed and stained with immunohistochemistry (IHC) for pathological examination. **Results** There was no difference in average body weight between the two groups. Alpha-diversity analysis showed that the Simpson's Diversity Index ($P < 0.05$, $P < 0.01$) was significantly lower in the AD group than CON group. At 6 and 10 weeks post-inoculation, the abundance-based coverage estimator ($P < 0.05$), Chao1 index ($P < 0.05$) and Shannon function ($P < 0.05$, $P < 0.01$) were higher in the AD group than the CON group. At the family level at 6 and 10 weeks post-inoculation, the relative abundances of Bacteriaceae were higher ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while those of Lachnospiraceae ($P < 0.001$) and Peptostreptococcaceae ($P < 0.05$, $P < 0.01$) were lower in the AD group compared with the CON group. At the genus level, Bacteroides ($P < 0.01$, $P < 0.05$) were higher in the AD group the AD group than the CON group. The relative abundances of Clostridioides ($P < 0.01$, $P < 0.05$), Lachnoclostridium ($P < 0.01$, $P < 0.0001$) and Parasutterella ($P < 0.01$, $P < 0.001$) were lower in the AD group than the CON group. β -diversity analysis showed that the CON and AD groups were distributed in different quadrants, but the same groups at different stages were distributed in the same quadrants, with a significant difference between the groups ($P < 0.05$). The A β 40 level in serum ($P < 0.05$) and cerebral homogenates ($P < 0.01$) were significantly higher in the AD group than the CON group at 10 weeks post-inoculation. In the AD group, the interleukin (IL)-1 β level was lower at 6 weeks ($P < 0.05$), the IL-10 level was higher at 10 weeks ($P < 0.01$), and the transforming growth factor- β level was lower at 6 weeks ($P < 0.01$) post-inoculation post-inoculation compared with the CON group. Pathological examination using IHC staining of the brain showed no senile plaques. **Conclusions** An HFA mouse model derived from AD patients was established via fecal microbiota transplantation. The main advantage of using bacteria from AD patients was that the GF mice were well colonized.

[Keywords] Alzheimer's disease; intestinal flora; germ-free mice; human flora-associated animal

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种退行性中枢神经系统病变,起病隐匿,呈进行性发展。主要临床表现为记忆认知障碍、精神人格行为异常。神经原纤维缠结、老年斑沉积、神经元的广泛缺失是这种疾病的特征性病理改变^[1-2]。目前 AD 是最常见的一种老年痴呆症,在中国患者数已超过 600 万,60 岁人群中 AD 的患病率为 3% ~ 5%。在世界范围 AD 患者达 3.5 亿,到 2030 年将超过 6 亿,85 岁以上人群发病率可能超过 50%。最近的研究表明,肠道微生物组与 AD 之间存在密切关联^[3-4],大量数据显示正常肠道菌群对机体脑功能的维持具有重要作用,而肠道菌群失调可能与 AD 的危险因素如年龄、应激、肥胖和糖尿病等密切相关,并可能参与多种 AD 伴发精神症状如焦虑、抑郁等的发病。

动物模型是研究肠道菌群与 AD 关系的重要工具。无菌动物 (germ free animal, GF) 是通过无菌剖宫产或无菌胚胎移植术获得,在无菌状态下繁育,采用现有检测手段检测不到活的微生物、寄生虫的动物^[5]。利用 GF 小鼠移植人粪便构建的人源菌群动物 (human-flora animal, HFA),通过在 GF 小鼠体

内模拟人的肠道微环境,为研究人肠道微生态系统提供了一个更为直接、有效的模型,其优势在于能有效控制宿主的遗传背景、菌群、饮食及其它环境因素^[6-7]。本研究选用无菌小鼠为实验对象,通过粪菌移植方法将 AD 患者肠道菌群移植到无菌小鼠体内,运用生物信息学、代谢组学方法结合动物的临床症状、组织病理学分析等手段对模型进行评价,为探索肠道菌群在 AD 发生发展中的病理生理机制提供研究基础,为早期发现、治疗 AD 提供研究工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

无菌级 C57BL/6J 小鼠 28 只,体重 17 ~ 22 g 均为雌性,课题组自己繁育并饲养于无菌隔离设施中。动物实验期间隔离器内温度 22 ~ 25℃,湿度 40% ~ 70%。动物在隔离器内自由摄食饮水。实验所用无菌小鼠饲料经 50 kGy ⁶⁰Co γ 射线辐照灭菌,饲育用饮水、垫料、笼具、灌胃针等经 126℃, 30 min 的高温高压灭菌处理。隔离设施合格证号

【SYXK-(京)2018-0019】。实验获本研究所实验动物使用与管理委员会批准(批准号:ZH17003)。

1.1.2 主要试剂与仪器

徕卡 ASP300S 全自动组织脱水机、徕卡 1150H +C 石蜡包埋机、樱花 IVS410 石蜡切片机、Bio-Rad IQ5PCR 仪。Bio-Plex MAGPIX System 悬液微珠芯片平台。抗体芯片检测试剂盒 Bio-Plex Pro Mouse Cytokine(货号 M60013RDPD)。老年斑染色 6E10 抗体, Biolegend(货号 IG-39320)。

1.2 方法

1.2.1 粪便供体信息

移植当日各有 3 位阿尔茨海默症患者、3 位健康志愿者符合粪便供体标准(见表 1)。患者及健康志愿者样品的采集已获得中国医学科学院北京协和医院伦理委员会批准,伦理审核号:S-K478。阿尔茨海默症患者及健康志愿者均来自中国北方,为典型非素食中国饮食。符合 2011 版国际阿尔茨海默症诊断标准^[8];排除非典型或继发性 AD;无其它神经精神症状;消化道无器质性病变,未进行过手术;无酒精依赖、吸烟、糖尿病等代谢性疾病;粪便采集前 4~8 周内未服用益生菌、抗生素、非甾体类药物。

1.2.2 建立粪菌移植模型

28 只 6~8 周龄无菌 C57BL/6J 小鼠,雌性,分为健康对照组(CON)和阿尔茨海默症(AD)组,每组 14 只。收集志愿者清晨排出的新鲜粪便,无菌、厌氧条件下分别将健康人和 AD 患者的粪便混匀。各称取 1 g 用 100 mL 0.1 mol/L PBS(pH=7.2)溶解,振荡混匀后用无菌纱布过滤粪便残渣后制成粪便菌悬液。每只无菌小鼠经口灌胃接种 0.4 mL 粪便悬液。

1.2.3 检测指标

接种粪便悬液后每天观察动物生长情况,每周测量体重。移植 6 周安乐 7 只动物,移植 10 周安乐剩余,解剖时检测指标:

(1) 16S rDNA 扩增子测序

动物在解剖前采集粪便。粪便收集在隔离器内完成,装入无菌冻存管传出,存入-80℃冰箱。动物实验结束后统一按参考文献^[9]的方法提取基因组 DNA、构建文库、上机测序并对结果进行分析。

(2) 脑内及血中 A β 含量测定

动物安乐死后,取血,血液用 10 000 r/min 离心 10 min,取上清。冰盘上剥离脑组织分成两半,右半球嗅球及小脑,用预冷的生理盐水冲洗,吸干水分后制成 10% 脑组织匀浆。酶联免疫吸附法测定血清及脑匀浆中 A β 40 和 A β 42 含量。

(4) 细胞因子

使用抗体芯片技术检测血清种 IL-1 β 、IL-10、IL-6、TNF- α 、IL-33、TGF- β 等与脑部炎症相关的细胞因子。

(5) 组织病理学

小鼠左侧大脑固定于中性福尔马林溶液,24 h 内进行脱水、透明、浸蜡、包埋处理,制作横断面切片,厚度 5 μ m。切片隔 3 取 1,贴到经多聚赖氨酸处理过的玻片上,按照文献^[10]的方法对小鼠海马和皮层内进行老年斑免疫组化染色,观察是否有老年斑生成。

1.3 统计学分析

数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,分析使用 SPSS 22.0 软件包,组间比较使用 t 检验,率的比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

表 1 实验志愿者信息

Table 1 General information of the volunteers

项目 Items	健康对照 1 Healthy control 1	健康对照 2 Healthy control 2	健康对照 3 Healthy control 3	AD 患者 1 AD patient 1	AD 患者 2 AD patient 2	AD 患者 3 AD patient 3
性别 Gender	男	女	女	男	女	女
年龄 Age	58	63	60	66	69	65
舒张压(mmHg) Diastolic pressure(mmHg)	119	122	110	133	138	129
收缩压(mmHg) Systolic pressure(mmHg)	68	79	80	84	83	80
体质量指数(kg/m ²) BMI(kg/m ²)	22.94	23.55	21.23	24.85	23.63	24.67
血糖(mmol/L) GLU(mmol/L)	5.79	5.08	4.98	5.97	5.88	5.93

2 结果

2.1 症状和体征

从动物实验开始到被安乐时止,所有小鼠摄食饮水正常、毛色顺滑、精神良好。对照组动物体重增平稳,模型组小鼠从第 5 周开始体重增长加放缓,与 CON 组比较,除第 8 周外差异无显著性(图 1)。

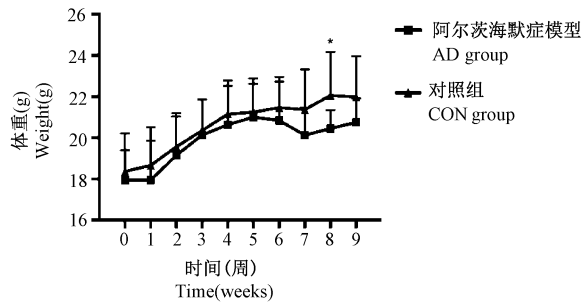


图 1 动物体重变化

Figure 1 Changes of body weights in the CON and AD groups

2.2 16S rDNA 扩增子测序

2.2.1 菌群多样性检测结果

OTUs 数可直观反映样本中物种丰富度和均匀度。各组检测出的 OTUs 在 97% (种) 水平上进行划分后将代表序列与数据库注释文件进行对比,结果显示 AD 组在粪菌移植后 6 周、10 周 2 个时间点获得的 OTUs 数均减少,与 CON 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。α 多样性反映的是单个样本内微生物群落的丰富度和多样性,Shannon 指数大、Simpson 指数小表示肠道菌群多样性强,ACE 和 Chao1 指数大表示菌群丰度高。AD 组粪菌移植后 6 周、10 周的 Shannon 指数均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),Simpson 指数均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); ACE 指数、Chao1 指数在粪菌移植后 6 周、10 周的

数值均降低 ($P < 0.05$),与 CON 组比较差异有统计学意义(见表 2)。

2.2.2 肠道菌群在科和属水平上的构成

在科水平,造模 2 个时间点 AD 组拟杆菌科丰度升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$,图 2A),与 CON 比较差异有显著性。毛螺菌科 ($P < 0.001$,图 2B)、消化链球菌科 ($P < 0.01$,图 2C) 丰度降低,与 CON 比较差异有显著性。

在属水平,造模 2 个时间点 AD 组拟杆菌属丰度升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$,图 3A),与 CON 比较差异有显著性。梭菌属 ($P < 0.01$, $P < 0.05$,图 3B)、毛螺菌属 ($P < 0.01$, $P < 0.0001$,图 3C)、寄生菌属 ($P < 0.01$, $P < 0.001$,图 3D) 丰度降低,与 CON 比较差异有显著性。

2.2.3 UPGMA 聚类树和主坐标分析

UPGMA 聚类树是根据加权 Unifrac 或非加权 Unifrac 距离将距离最小的样本聚在一起,形成一个新的聚点,通过不断将聚点进行聚集,获得聚类树。比较 2 组的 UPGMA 聚类结果:AD 组、CON 组在移植后 6 周、10 周时的加权 Unifrac 距离分别为 0.732、0.751,表明 AD 组与 CON 组在菌群丰富度多样性方面存在明显分离,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 4A)。基于加权 Unifrac 距离的主坐标分析结果显示,粪菌移植后 CON 组、AD 组肠道菌群分布在不同区域,组间分离明显。而同组不同时间点的菌群群落则分布在相同区域甚至互相重叠,聚合较好。(图 4B)。

2.3 血液及脑中 Aβ 含量

AD 组小鼠在建模 10 周时血液和脑中 Aβ40 含量升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$,图 5A,5C),与 CON 组比较差异有显著性。血液和脑中的 Aβ42 含量在两

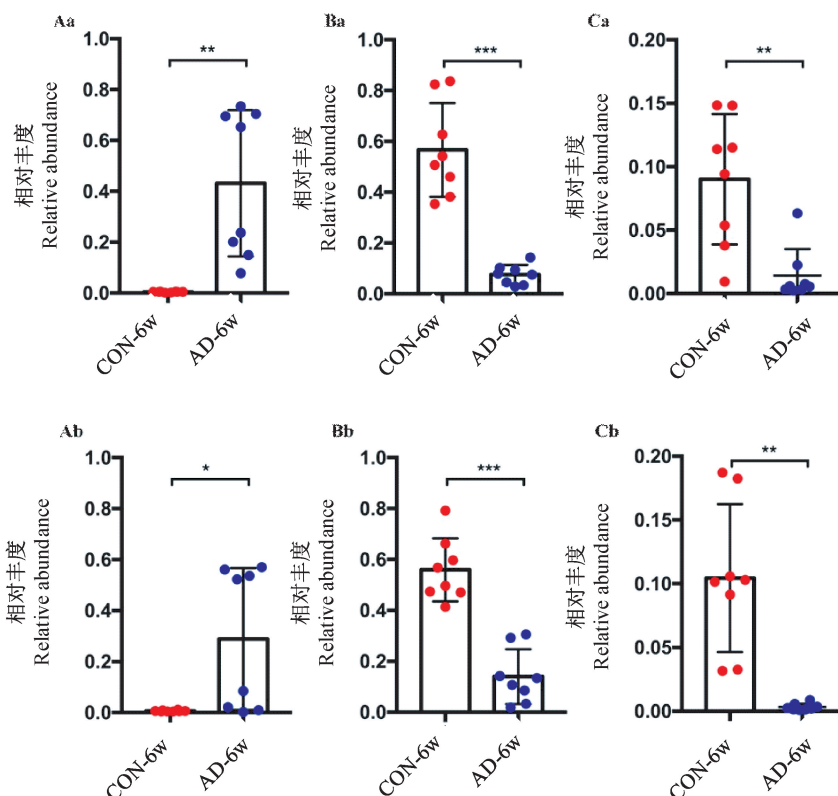
表 2 模型组与对照组肠道菌群 α-多样性指数分析结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the α-diversity indexes of gut microbiota between the CON and AD groups ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	OUTs		Chao1		Shannon		Simpson		ACE	
	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage
对照组 Control group	343.00 ± 97.50	309.30 ± 72.70	484.19 ± 32.15	416.52 ± 71.04	4.10 ± 0.78	4.02 ± 0.65	0.86 ± 0.17	0.90 ± 0.13	497.62 ± 82.29	440.60 ± 95.24
模型组 AD group	878.20 ± 105.10	551.80 ± 142.22	1024.18 ± 106.39	685.61 ± 99.41	5.48 ± 0.45	4.37 ± 0.71	0.91 ± 0.12	0.77 ± 0.11	1015.02 ± 116.42	695.87 ± 109.17
P	0.0001 **	0.1192	0.0002 *	0.0944	0.0484 *	0.8912	0.7814	0.0747	0.0003 **	0.1141

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.



注:与对照组较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

图2 肠道菌群在科水平上的构成

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 2 Relative abundance of the bacteria in gut microbiota at family level in the CON and AD groups

个时间点均未见差异有显著性(图 5B,5D)。

2.4 细胞因子检测

检测结果显示,与老年斑形成相关的细胞因子中,IL-1 β 在建模 6 周时浓度降低 ($P < 0.05$, 图 6A);IL-10 在建模 6 周时浓度升高 ($P < 0.01$, 图 6B);TGF- β 在建模 10 周时浓度降低 ($P < 0.01$, 图 6C),与 CON 组比较差异有显著性。IL-6、IL-33、TNF- α 在建模 6 周和 10 周时差异均无统计学意义(图 6D、6E、6F)。

2.5 组织病理学结果

在造模的 2 个时间点,CON 组(图 7A,7C)和 AD 组(图 7B,7D)小鼠脑内均未观察到有老年斑生成。

3 讨论

已有多篇文献报道人类肠道菌群可在无菌大、小鼠体内定植,其肠道菌群构成保持了人肠道菌群的特征,在肠道细菌数量、代谢速率和酶活性等方面与人体内菌群相似^[11-13]。大小鼠体积小,相对经济,更适于进行日益增长的肠道微生态与疾病相关

研究的需求。国内外大量报道的啮齿类人源化动物模型以小鼠为主,应用于肠道菌群与疾病关系、肠道菌群对免疫系统影响、益生菌益生元的安全性有效性评价等研究中^[14-16]。但针对阿尔茨海默症建立的人源化动物模型国内还未见报道。

根据 Hazenberg 等^[17]、Che 等^[18]的研究结果和本课题组前期建立冠心病 HFA 小鼠的经验^[9],本研究选择经口途径接种志愿者粪便菌悬液建立小鼠模型,在建模 6 周、10 周时收集小鼠的新鲜粪便、血液、脑组织样本检测菌群结构丰度、细胞因子、老年斑生成等指标。 α -多样性分析结果显示,AD 组的 Shannon 指数在粪菌移植后 6 周、10 周两个时间点均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 Simpson 指数均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Shannon 指数大、Simpson 指数小表示肠道菌群的多样性强,结果提示 AD 模型组小鼠肠道菌群多样性降低。在科和属的水平,拟杆菌科和拟杆菌属的菌群丰度显著升高,与文献报道^[19]的人的结果一致。 β -多样性分析结果显示 CON 组和 AD 组小鼠的 Weighted Unifrac 距离组间明显分离,差异有显著性($P < 0.05$)。CON 组、AD

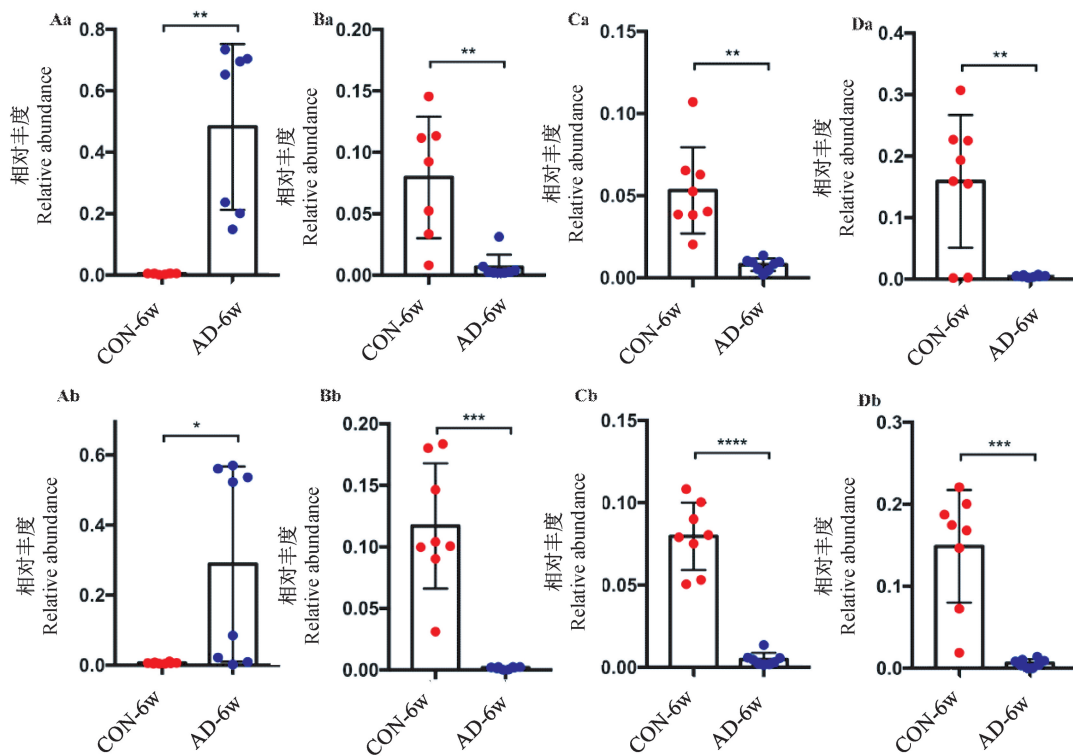
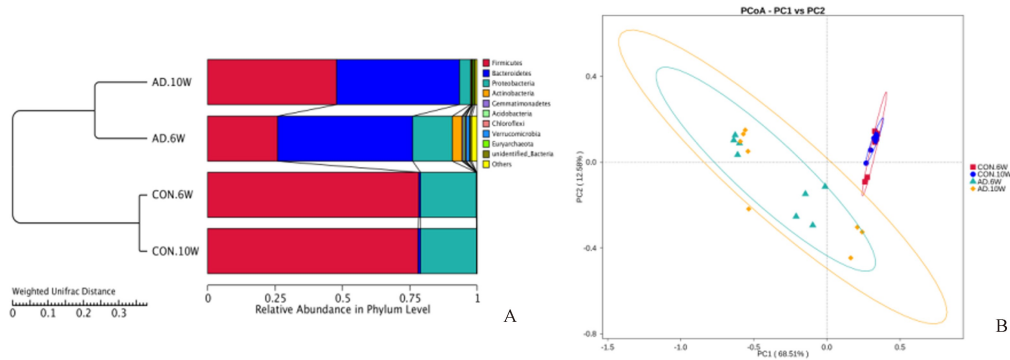
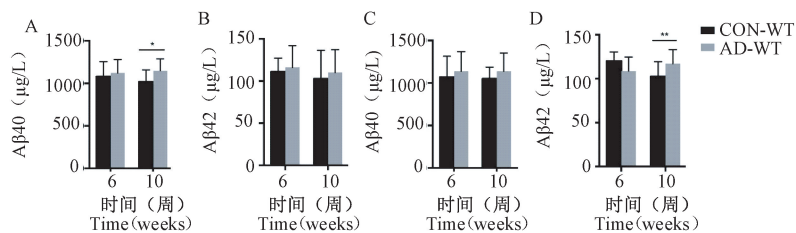


图 3 肠道菌群在属水平上的构成

Figure 3 Relative abundance of the bacteria in gut microbiota at genus level in the CON and AD groups

图 4 β -多样性分析结果Figure 4 β -diversity analysis of the CON and AD groups图 5 血清和脑内 $A\beta$ 含量检测结果Figure 5 Detection of the $A\beta$ level in serum lipid and brain in the CON and AD groups

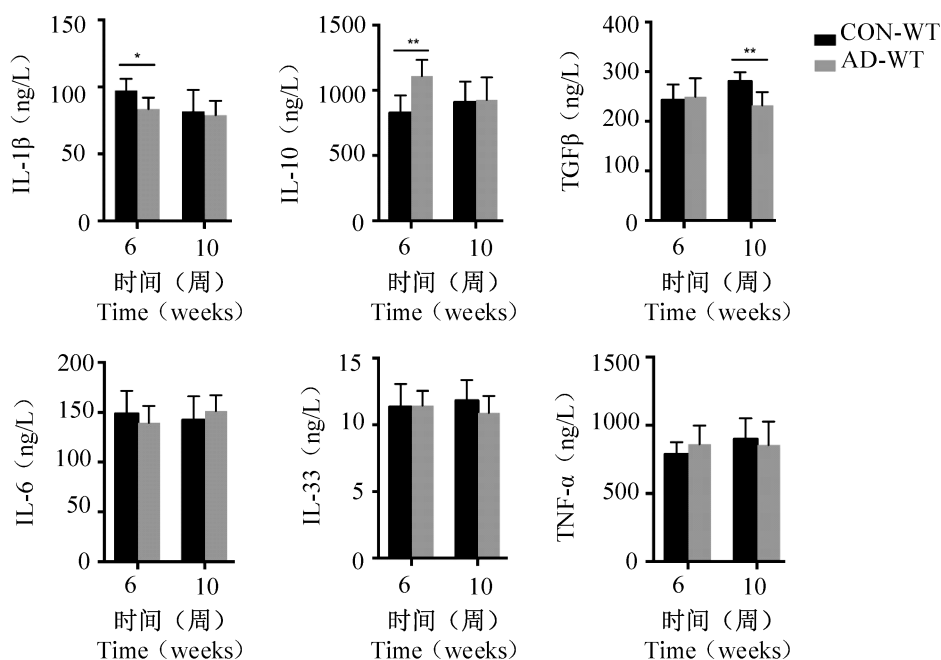


图 6 细胞因子检测结果

Figure 6 The serum levels of cytokines in the CON and AD groups

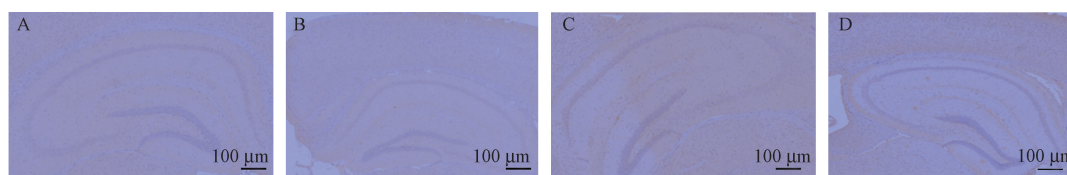


图 7 脑内老年斑检测

Figure 7 Histopathological changes in the brain of the CON and the AD groups

组小鼠组内建模后不同时间点菌群群落分布同一象限,聚合较好。而 2 组间菌群分布在不同区域,表明志愿者肠道菌群在无菌小鼠体内定植,且模型组、对照组小鼠肠道的微生物区系存在明显差异。

据文献报道,AD 患者肠道微生物变化与慢性神经炎症相关。由促炎分子引发的神经炎症引起血脑屏障的通透性增加,炎症反应加重,最终导致胶质细胞增生及神经元丢失^[20-22]。拟杆菌属是革兰氏阴性菌,脂多糖是其外膜的主要成分,可引发全身性炎症并促进促炎细胞因子的释放。脂多糖还与 AD 病理学相关,当与 Aβ 肽共孵育时脂多糖可增强淀粉样蛋白原纤维形成。在动物中全身注射脂多糖可增强小胶质细胞活性,促炎细胞因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平增加,引起淀粉样蛋白沉积和 tau 相关病理学改变^[23]。但 AD 是一种复杂的慢性退行性疾病,衰老、遗传、外周病变和环境因素都可能成为其诱发因素。本研究通过经口粪菌移植方式建立了阿尔茨海默症 HFA 小鼠模型,模型小鼠的肠道菌群结构与丰度出现了与患者类似的改变,

拟杆菌属丰度显著增加,可用于菌群与 AD 关系、相关微生态制剂评价等。但相关炎症因子、血液及脑内 Aβ 含量等并未出现有统计学意义的改变,需要结合遗传、衰老等因素做进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Hong SY, Jeong WS, Jun M. Protective effects of the key compounds isolated from Corni fructus against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. *Molecules*, 2012, 17 (9): 10831-10845.
- [2] Alzheimer's association. 2015 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2015, 11(3): 332-384.
- [3] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. *Nature*, 2010, 464(7285): 59-65.
- [4] Sochocka M, Donskow LK, Diniz BS, et al. The gut microbiome alterations and inflammation-driven pathogenesis of Alzheimer's disease-a critical review [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(3): 1841-1851.
- [5] Wostmann BS, Pleasants JR. The germ-free animal fed chemically defined diet: a unique tool [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1991, 198(1): 539-546.

- [6] Hirayama K, Itoh K. Human flora-associated (HFA) animals as a model for studying the role of intestinal flora in human health and disease [J]. *Curr Issues Intest Microbiol*, 2005, 6(2): 69–75.
- [7] Faith JJ, Rey FE, O'Donnell D, et al. Creating and characterizing communities of human gut microbes in gnotobiotic mice [J]. *ISME J*, 2010, 4(9): 1094–1098.
- [8] Albert MS, Deksky ST, Dickson D, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7(3): 270–279.
- [9] 朱华, 李卓, 苏磊, 等. 冠心病人群肠道菌群小鼠模型的建立及评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(6): 716–724.
- Zhu H, Li Z, Su L, et al. Establishment and evaluation of human flora-associated mouse model correlated with coronary heart disease [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(6): 716–724.
- [10] Song N, Zhang L, Qin C, et al. Cyanidin 3-O- β -glucopyranoside activates peroxisome proliferator-activated receptor- γ and alleviates cognitive impairment in the APPswe/PS1 Δ E9 mouse model [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 9(9): 1786–1800.
- [11] Wu X, Ma C, Han L, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes [J]. *Curr Microbiol*, 2010, 61(1): 69–78.
- [12] Burcelin R, Serino M, Chabo C, et al. Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective [J]. *Acta Diabetol*, 2011, 48(4): 257–273.
- [13] Zhang X, Shen D, Feng Z, et al. Human gut microbiota change reveal the progression of glucose intolerance [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71108.
- [14] Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 55–60.
- [15] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2007, 56(7): 1761–1772.
- [16] Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia [J]. *Diabetologia*, 2007, 50(11): 2374–2383.
- [17] Hazenberg MP. Effects of the human intestinal flora on germ-free mice [J]. *J App Bacteriol*, 1981, 50(1): 95–106.
- [18] Che C, Pang X, Hua X, et al. Effects of human fecal flora on intestinal morphology and mucosal immunity in human flora-associated piglet [J]. *Scand J Immunol*, 2009, 69(4): 223–233.
- [19] Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13537.
- [20] Heneka MT, Carson MJ, Khoury JE, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(4): 388–405.
- [21] Batarseh YS, Duong QV, Mousa YM, et al. Amyloid-beta and astrocytes interplay in amyloid-beta related disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 338.
- [22] Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier [J]. *Nat Med*, 2013, 19(12): 1584–1596.
- [23] Sheng JG, Bora SH, Xu G, et al. Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APPswe transgenic mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2003, 14(1): 133–145.

[收稿日期] 2020-06-02