

徐美玲,张帆,张瑜,等. Prnp-SNCA-A53T 帕金森病转基因小鼠肠道菌群差异 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 284-292.

Xu ML, Zhang F, Zhang Y, et al. Differences in gut microbiota of Prnp-SNCA-A53T Parkinson's disease transgenic mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 284-292.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2021. 03. 002

Prnp-SNCA-A53T 帕金森病转基因小鼠肠道菌群差异

徐美玲¹, 张帆¹, 张瑜^{1,2}, 桑明^{1,2}, 王普清^{1,2*}

(1. 湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院, 湖北 襄阳 441000; 2. 湖北省帕金森病临床医学研究中心, 湖北 襄阳 441000)

【摘要】 目的 多项证据表明帕金森病患者肠道菌群失调,而 Prnp-SNCA-A53T 帕金森病转基因小鼠是否存在肠道菌群失调尚未见报道,本研究拟对该模型小鼠的肠道微生物生态特征进行分析。**方法** 采用 illumina 高通量测序技术对 7 只雌性转基因小鼠及 13 只同性别同周龄野生型小鼠粪便微生物 16S rRNA 基因 V3-V4 区进行测序及生物信息分析,并用 PICRUST 预测差异功能通路。**结果** 与野生型组相比,A53T 组小鼠肠道微生物 α 多样性有增高趋势,而且微生物组成及物种也具有显著性差异:A53T 组小鼠肠道微生物在门水平,放线菌门增高 ($P=0.0094$),拟杆菌门降低 ($P=0.0498$);在纲水平,红螯菌纲增高 ($P<0.0001$),拟杆菌纲降低 ($P=0.0398$);在目水平,红螯杆菌目增高 ($P<0.0001$),拟杆菌目 ($P=0.0398$) 及红细菌目降低 ($P=0.0185$);在科水平,红螯杆菌科增高 ($P<0.0001$),拟杆菌科 ($P=0.0277$) 及红杆菌科降低 ($P=0.0185$);在属水平,伊格尔兹氏菌属增高 ($P=0.0002$),拟杆菌属 ($P=0.0277$) 及红杆菌属降低 ($P=0.0249$)。另外 A53T 组与野生型组在 9 个功能通路上存在显著差异,分别是 G 蛋白偶联受体、类固醇激素的合成、青霉素和头孢菌素的生物合成、泛醌和其他萘类醌的生物合成、甲苯降解的生物合成与代谢、聚糖的生物合成与代谢、电子转移载体、减数分裂以及非洲锥虫病。**结论** 本研究结果表明转基因小鼠存在肠道菌群失调,同时转基因模型小鼠与野生型小鼠代谢通路存在差异,为后期研究肠道菌群菌与帕金森病的关联性提供了理论基础。

【关键词】 转基因模型小鼠;野生型小鼠;肠道菌群;菌群多样性;信号通路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 03-0284-09

Differences in gut microbiota of Prnp-SNCA-A53T Parkinson's disease transgenic mice

XU Meiling¹, ZHANG Fan¹, ZHANG Yu^{1,2}, SANG Ming^{1,2}, WANG Puqing^{1,2*}

(1. Xiangyang No.1 People's Hospital, Hubei University of Medicine, Xiangyang 441000, China.
2. Hubei Clinical Research Center of Parkinson's Disease, Xiangyang 441000)

Corresponding author: WANG Puqing. E-mail:1956342976@qq.com

【Abstract】 Objective Evidence indicate that the gut microbiota of Parkinson's disease patients is imbalanced, but whether the Prnp-SNCA-A53T Parkinson's disease transgenic mouse model also has gut microbiota imbalances is unknown. This study aimed to analyze the ecological characteristics of the gut microbiota of this mouse model. **Methods**

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81703496), 湖北医药学院基金项目 (FDFR201615), 湖北医药学院药护学院团队项目 (2017YHKT02), 湖北省实验动物资源开发及利用项目 (2020DFE025), 湖北省技术创新专项对外科技合作类 (2019AHB068), 湖北医药学院研究生科技创新项目 (YC2020027)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81703496), Hubei Medical College Fund Project(FDFR201615), the Innovative Team Project from the Institute of Medicine and Nursing at Hubei University of Medicine (2017YHKT02), the Experimental Animal Resources Development and Utilization Project of Hubei Province of China(2020DFE025), the Hubei Province Innovation Project of Science and Technology Cooperation with Foreign Countries (2019AHB068), Postgraduate Science and Technology Innovation Program of Hubei University of Medicine (YC2020027).

【作者简介】 徐美玲 (1992—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 帕金森病。Email:1090370354@qq.com

【通信作者】 王普清 (1967—), 男, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向: 帕金森病。Email:1956342976@qq.com

Illumina high-throughput sequencing technology was performed to sequence and analyze the biological information of the 16S rRNA gene V3 - V4 region of the fecal microbiota in seven female transgenic mice and 13 wild-type mice of the same sex and age. PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) was used to predict the differential function pathways. **Results** Compared with the wild-type group, the gut microbial alpha diversity of mice in the A53T group had a tendency to increase, and there were also significant differences in microbial composition and species. At the phylum level, the Actinobacteria were increased ($P=0.0094$), and the Bacteroidetes were decreased ($P=0.0498$). At the class level, the Coriobacteriia were increased ($P<0.0001$), and the Bacteroidia were decreased ($P=0.0398$). At the order level, the Coriobacteriales were increased ($P<0.0001$), while the Bacteroidales ($P=0.0398$) and the Rhodobacterales were decreased ($P=0.0185$). At the family level, the Coriobacteriaceae were increased ($P<0.0001$), while the Bacteroidaceae ($P=0.0277$) and the Rhodobacteraceae were decreased ($P=0.0185$). At the genus level, the Eggerthella were increased ($P=0.0002$), while the Bacteroides ($P=0.0277$) and the Rhodobacter were decreased ($P=0.0249$). In addition, there were significant differences between the A53T group and the wild-type group in nine functional pathways, including G protein-coupled receptor, steroid hormone biosynthesis, penicillin and cephalosporin biosynthesis, ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis, toluene degradation, glycan biosynthesis and metabolism, electron transfer carriers, meiosis - yeast, and African trypanosomiasis. **Conclusions** This study indicated that there are imbalances in the gut microbiota of transgenic mice, as well as differences in metabolic pathways between the transgenic mice and the wild-type mice.

【**Keywords**】 transgenic mice; wild-type mice; gut microbiota; bacterial diversity; signal path

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

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是常见的神经系统变性疾病,其主要病理改变为中脑黑质多巴胺能神经元的进行性脱失,残存神经元中 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)聚集形成路易小体^[1]。常见临床表现包括运动症状(肌强直、运动迟缓、静止性震颤、姿势步态障碍)和非运动症状(胃肠功能紊乱、便秘、嗅觉障碍、抑郁、睡眠紊乱、认知障碍和自闭等),其中部分非运动症状的出现明显早于运动症状。目前PD确切病因仍不清楚,过去的研究显示PD与遗传及环境等因素有关,但近年来,诸多的证据表明PD的发病可能起源于胃肠道且与肠道菌群失调有关^[2-5]。其中1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)毒物模型及 α -突触核蛋白转基因小鼠模型均被用于PD研究。MPTP帕金森病模型小鼠已被证实存在肠道菌群失调^[6-7],而 α -突触核蛋白转基因小鼠模型是否存在菌群失调尚未进行全面研究。

目前有多种 α -突触核蛋白转基因小鼠模型, α -突触核蛋白点突变A53T被证实与PD相关^[8-9]。其中Prnp-SNCA-A53T转基因小鼠模型是将A53T突变型人 α -突触核蛋白基因导入小鼠体内,同时在Prnp启动子下表达。该模型可以很好的模拟帕金森症的发病情况,是研究PD发病机制较理想的小鼠模型。但是该模型小鼠是否也存在肠道菌群失调尚未见文献报道。

因此,本研究拟通过illumina高通量测序技术对Prnp-SNCA-A53T转基因模型小鼠肠道微生物生态特征进行分析研究,为探究粪便微生物与PD的相关性提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

7只13周龄SPF级雌性A53T转基因小鼠及13只同性别同周龄野生型C57BL/6小鼠,共20只,体重20~24g。Prnp-SNCA-A53T小鼠【SCXK(苏)2018-0008】由武汉大学张振涛教授实验室【SYXK(鄂)2015-0027】赠予,送至华中农业大学进行快速扩繁【SYXK(鄂)2015-0019】后,饲养于湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院中心实验室【SYXK(鄂)2017-0093】,饲养期间各组小鼠可自由获得食物和水。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度控制在40%~60%,温度控制在 $(24\pm2)^{\circ}\text{C}$ 。本研究方案获湖北医药学院附属襄阳第一人民医院伦理委员会批准(2019DW008),并按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。

1.1.2 主要试剂与仪器

TIANamp 粪便基因组DNA提取试剂盒(DP328-02, TIANGEN), AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 AP-GX-250(Scipu003357, AXYGEN)。

生物安全柜(Hfsmfe-1500LC,上海力申科学(力康),中国),电泳仪,微量分光光度计(N50 Touch, Nanophotometer, 德国), NovaSeq 6000 测序仪(Illumina, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与实验设计

选取 7 只 SPF 级雌性 A53T 转基因小鼠作为 A53T 组,同时选取同性别同周龄 13 只野生型 C57BL/6 小鼠作为对照组。所有小鼠在 13 周龄时收集粪便样品。

1.2.2 粪便的留取及其细菌 DNA 提取

在生物安全柜中分别收集每只小鼠新鲜粪便于无菌 EP 管中,按照粪便基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取粪便细菌总 DNA。用分光光度计检测 DNA 浓度和纯度。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 进行质量检测,检测合格的 DNA 保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.2.3 16S rRNA 扩增及测序

粪菌 DNA 冷链邮寄至微基生物科技(上海)有限公司,使用 NGS Illumina 进行细菌 16S rRNA 高通量测序。其中扩增 16S V3-V4 可变区的通用引物为 357F (5'-ACTCCTACGGRAGGCAGCAG-3'), 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。

1.2.4 生物信息分析

下机后原始数据经过数据过滤,去除 N 含量超过 10%、低质量($Q \leq 5$)碱基数超过 50% 及 barcode 序列,以获得高质量的 Clean data 用于后期分析^[10]。通过 FastQC(v 0.11.8) 软件对 Clean data 进行质量评估,利用 QIIME2 软件按照 97% 的相似性阈值序列划分为操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。通过与 Green genes 13.5 数据库比对,对 OTU 进行物种注释。基于 OTU 和物种注释结果计算各样本在门(phylum),纲(class),目(order),科(family),属(genus) 5 个分类水平上的组成和相对丰度表,比较物种间差异。通过 α 多样性分析(α -diversity) 得到粪便微生物的物种丰度和多样性信息。通过 β 多样性分析(β -diversity) 分析两组组间物种的整体差异。最后利用 PICRUST 软件对样本中可能存在的各级 KEGG 通路及丰度值进行预测。

1.2.5 序列登录号

研究所得序列均已提交至 NCBI Sequence Read Archive 数据库中, Bio Project 编号为 PRJNA675446。

1.3 统计学分析

利用 R (4.0.2) 软件及 Graph Pad Prism (8.0.2) 进行统计分析。使用独立样本 t 检验统计两组间差异。统计结果用平均值 $\pm$ 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 样本测序量及小鼠肠道菌群多样性评估

本次高通量焦磷酸测序共产生 748 828 条高质量序列,其中 A53T 组获得 278 329 条有效序列(平均每个样品序列数为 $39\ 761 \pm 3064$);对照组获得 470 499 条有效序列(平均每个样品序列数为 $36\ 192 \pm 3311$)。A53T 组和对照组分别鉴定出 672 和 1041 个 OTU,其中 237 种 OTU 为 2 组共有,A53T 组包含 435 种特有 OTU,而对照组包含 804 种特有 OTU。 α 多样性可以体现组内微生物群落的丰富度和多样性。利用独立样本 t 检验对群落丰富度指数和群落多样性指数进行比较分析,结果如图 1 所示,其中 Goods_coverage 反映测序深度,两组测序的深度指数均接近 1,结果说明测序深度均已经覆盖到样本中的所有物种(图 1A)。ace 指数和 Shannon 多样性指数分别反映菌群丰度和多样性,结果显示,A53T 组的 ace 指数(图 1B)和 Shannon 多样性指数(图 1C)均大于对照组,但两者差异不显著。

2.2 肠道微生物 β 多样性分析

本文采用 weighted UniFrac 指数衡量 β 多样性, β 多样性分析是用来比较物种多样性的差异大小,利用该指数得到的分析图中距离越大表示样本间的差异越大。主坐标分析 PCoA 显示 A53T 组和对照组基本处于不同区域,提示两组之间多样性存在差异(见图 2)。

2.3 小鼠肠道菌群结构组成

所有样本共鉴定得到 8 个门、18 个纲、14 个目、15 个科和 38 个属。对 A53T 组及对照组小鼠肠道菌群结构进行分析,两组小鼠肠道菌群结构在门、纲、目、科及属水平均存在差异,其分组百分比堆积柱形图如图 3 所示。其中,两组小鼠肠道菌群结构在门水平主要由厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Actinobacteria)及放线菌门(Actinobacteria)组成,其中 A53T 组的含量分别为 17.1%、7.51%、0.88% 及 1.24%,而对照组分别为 21.84%、11.94%、1.13% 及 0.57%,在属水平主要由毛螺旋菌属(Moryella)、拟杆菌属(Bacteroides)

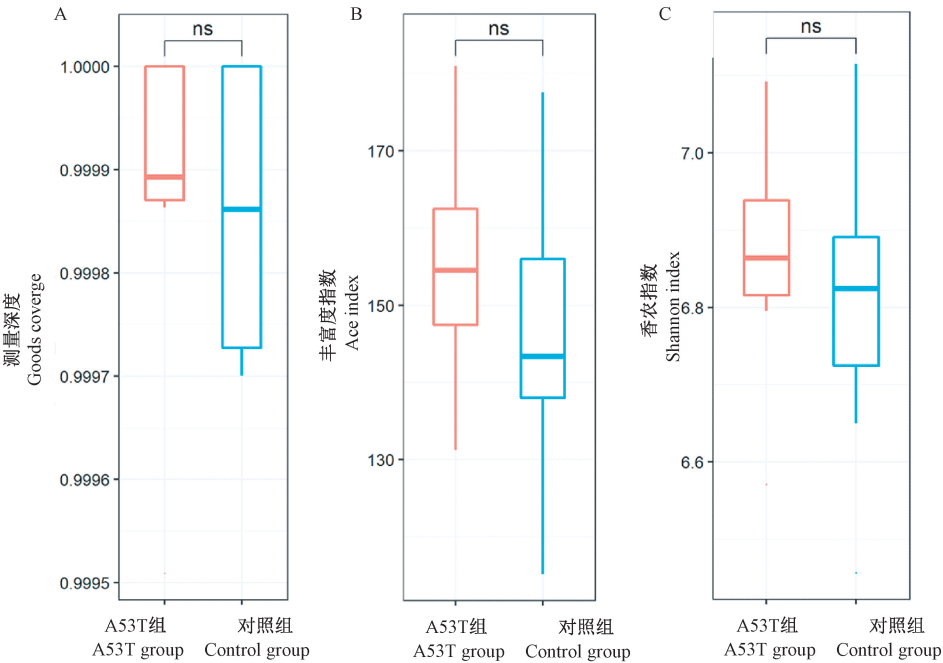


图 1 A53T 组与对照组小鼠肠道微生物 α 多样性分析
Figure 1 α-diversity analysis of gut microbes in A53T and control group

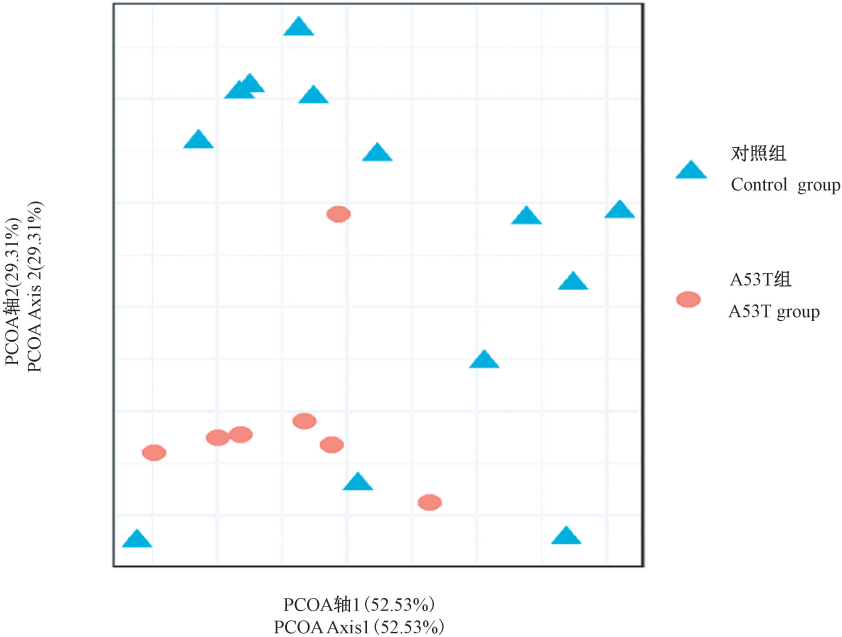


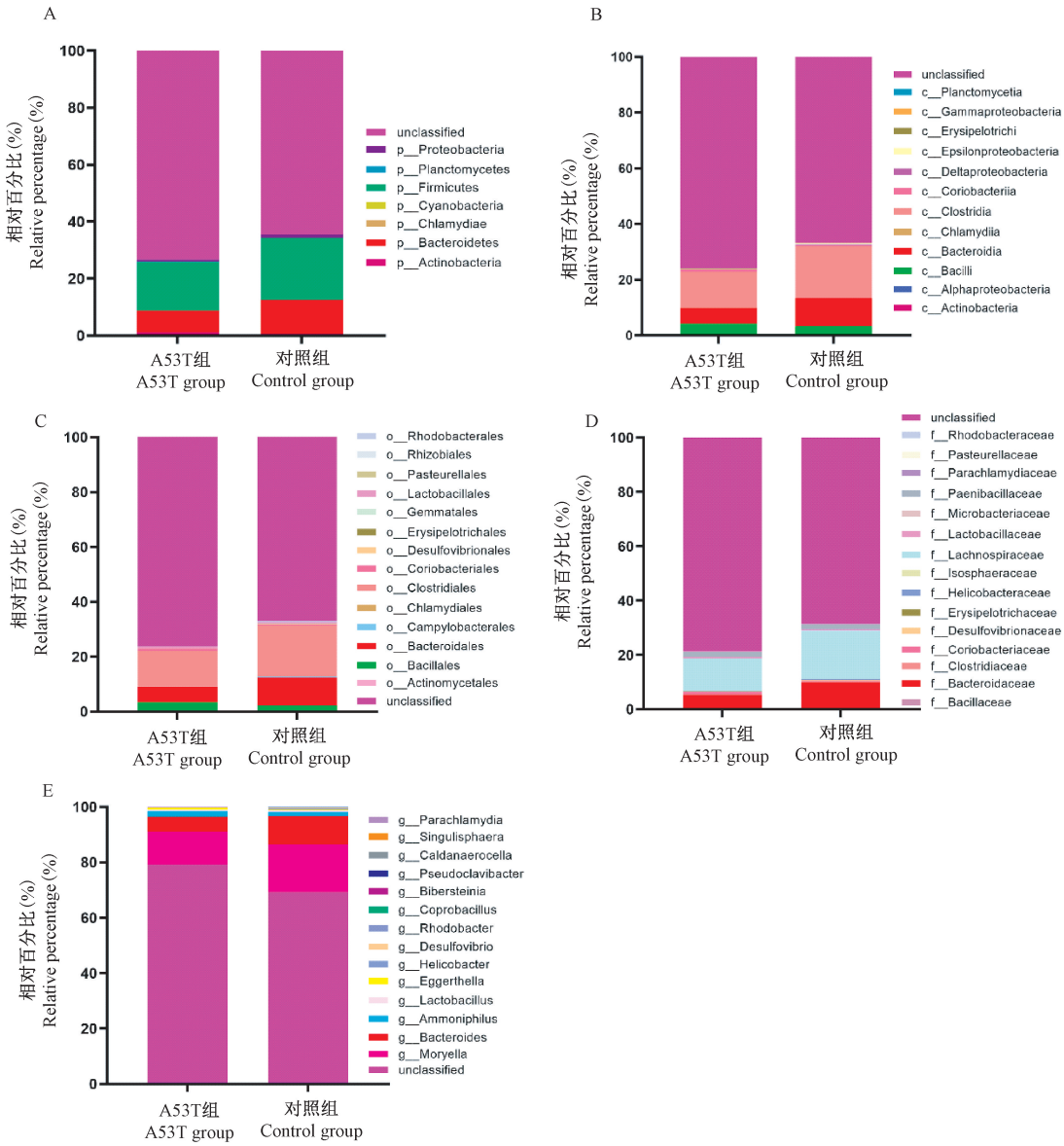
图 2 A53T 组与对照组小鼠肠道微生物 β 多样性分析
Figure 2 β-diversity analysis of gut microbes in A53T and control group

及李斯特氏菌属 (*Ammoniphilus*) 组成,其中 A53T 组的含量分别为 11.95%、5.36% 及 1.95%,而对照组分别为 17.38%、10.01% 及 1.66%。值得注意的是两组小鼠肠道中均存在大量无法鉴定的细菌。

2.4 两组小鼠肠道菌群差异物种分析

为了比较两组小鼠肠道菌群的差异物种,本

研究分别在门、纲、目、科及属水平分析肠道菌群的变化情况。在门水平,A53T 组小鼠肠道微生物中放线菌门相对含量显著较高 ($P=0.0094$),而拟杆菌门显著较低 ($P=0.0498$);在纲水平,红蠕菌纲 (*Coriobacteriia*) 增高 ($P<0.0001$),拟杆菌纲 (*Bacteroidia*) 降低 ($P=0.0398$);在目水平,红蠕杆



注: A: 门水平; B: 纲水平; C: 目水平; D: 科水平; E: 属水平。A53T 组 ($n=7$), 对照组 ($n=13$)。

图 3 A53T 组与对照组小鼠肠道微生物在门、纲、目、科及属水平分组百分比堆积柱形图

Note. A. Phylum level. B. Class level. C. Order level. D. Family level. E. Genus level. A53T mice ($n=7$), control mice ($n=13$).

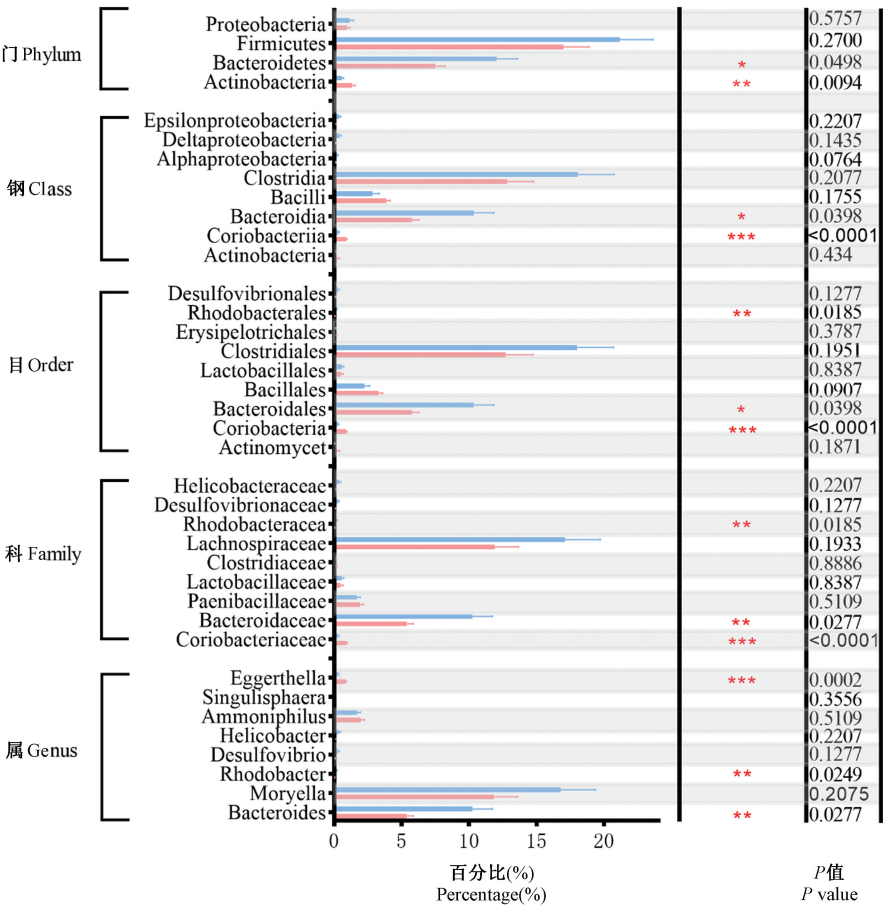
Figure 3 Analysis of the microbial structure at the phylum, class, order, family and genus level respectively in A53T and control group.

菌目 (Coriobacteriales) 增高 ($P < 0.0001$), 拟杆菌目 (Bacteroidales) 降低 ($P = 0.0398$), 红细菌目 (Rhodobacterales) 降低 ($P = 0.0185$); 在科水平, 红螭杆菌科 (Coriobacteriaceae) 增高 ($P < 0.0001$), 拟杆菌科 (Bacteroidaceae) 降低 ($P = 0.0277$), 红杆菌科 (Rhodobacteraceae) 降低 ($P = 0.0185$); 在属水平, 伊格尔兹氏菌属 (*Eggerthella*) 显著较高 ($P = 0.0002$), 而拟杆菌属 (*Bacteroides*) ($P = 0.0277$) 和红杆菌属 (*Rhodobacter*) 显著较低 ($P = 0.0249$)

(见图 4)。

2.5 PICRUST 肠道菌群功能预测分析

根据 OTUs 在每个样本中的表达丰度使用 PICRUST 在线预测功能对各级 KEGG 通路及丰度值进行预测, 共富集到 328 个功能通路, 与对照组相比, A53T 组有 9 条通路有显著性差异 ($P < 0.05$, 图 5), 其中与环境信息处理相关的是 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors); 与代谢相关的包括: 类固醇激素合成 (steroid hormone biosynthesis)、青霉



注: A53T 组(红色) $n=7$; 对照组(蓝色) $n=13$; 分别比较两组的微生物百分比含量, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

Figure 4 A53T 组与对照组肠道微生物物种差异分析

Note. A53T group (red) $n=7$. Control group (blue) $n=13$. Compare the percentage of microbe in the two groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 4 Analysis of the difference of gut microbial between A53T and control group

素和头孢菌素生物合成 (penicillin and cephalosporin biosynthesis)、泛醌和其他萜类醌的生物合成 (ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis)、甲苯降解 (toluene degradation) 及聚糖的生物合成与代谢 (glycan biosynthesis and metabolism); 与细胞过程相关的包括: 电子转移载体 (electron transfer carriers) 和减数分裂 (meiosis-yeast); 与人类疾病相关的是非洲锥虫病 (african trypanosomiasis)。说明 A53T 组与对照组之间的差异可能与这些功能通路相关。

3 讨论

胃肠道被称为人的第二大脑^[11-12], 其内寄居大量的肠道微生物, 正常的菌群结构保障人体代谢、免疫、内分泌功能处于较为稳定的水平, 而肠道菌

群紊乱与多种疾病的发生可能存在相关性^[13-17]。国内外多项研究显示 PD 患者与健康对照组相比肠道微生物存在差异^[4,18-23], 并提出肠道菌群紊乱可能与 PD 发病相关联, 但两者的因果关系尚不明确。目前多个研究者^[6-7]选用 MPTP 等毒物模型研究肠道微生物与 PD 相关性及其作用机制, 但是相比于毒物模型, 转基因模型可以更好地模拟帕金森病的病理学及行为学改变。因此, 本研究从多样性及物种结构水平上分析 Pmp-SNCA-A53T 帕金森病转基因小鼠肠道菌群情况, 并利用 PICRUST 预测其功能通路的变化。

本研究发现 A53T 组小鼠 α 多样性的 ace 指数及 Shannon 指数与对照组相比, 虽然没有显著差异, 但显示有上升趋势, 该结果同 MPTP 小鼠模型的研究存在一致性^[24]。 β 多样性及物种结构分析结果

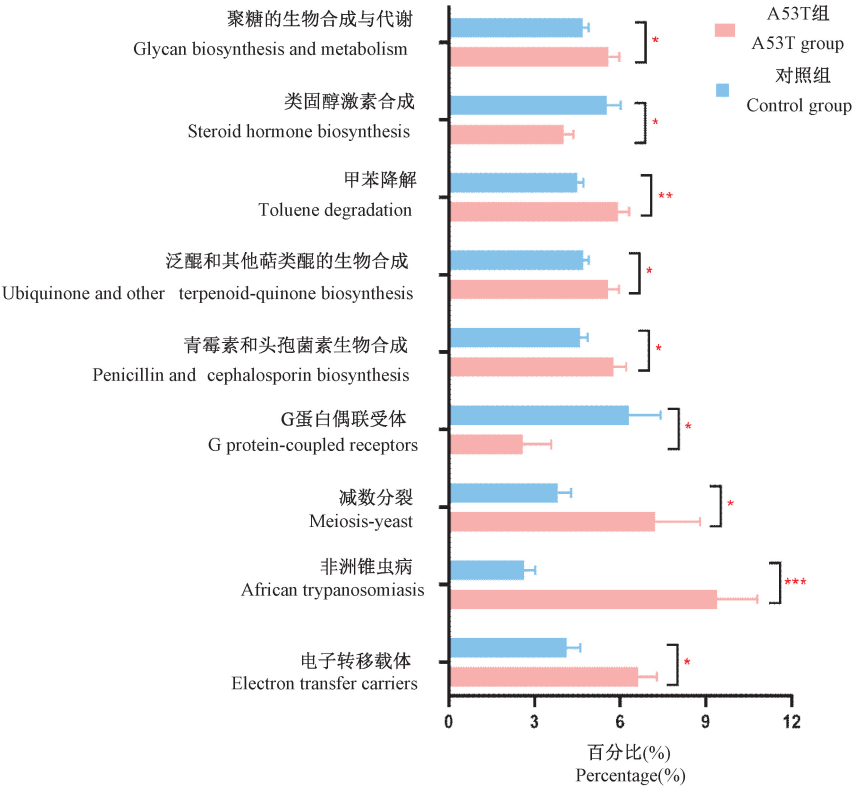


图 5 A53T 组与对照组差异通路图

Figure 5 Diagram of the differential pathway between A53T and control group

显示,两组的粪便微生物物种存在显著性差异,本研究分别在门、纲、目、科和属水平对差异菌群进行检测,发现转基因小鼠肠道微生物的放线菌门、红螯菌纲及伊格尔兹氏菌属增高,而拟杆菌门及红细菌目降低,与在 PD 患者肠道微生物研究结果具有相似性^[25-26]。

其中放线菌是厌氧或兼性厌氧菌,主要寄居在口腔、呼吸道、消化道和泌尿道的一种条件致病菌,当机体抵抗力下降时,可导致各种感染^[27]。有研究认为帕金森病可能是放线菌潜伏感染所诱发的,随着年龄的增长或者放线菌吞噬功能减退时引发 PD^[28]。伊格尔兹氏菌也属于放线菌门,被认为与炎症相关。同时,本研究在转基因小鼠中还发现红螯菌丰度增高,有研究报道发现肥胖个体肠道菌群中红螯菌科丰度增高,提示该物种可能具有导致代谢紊乱的作用^[29]。

本研究还发现,相对于野生型小鼠,A53T 转基因小鼠肠道拟杆菌门及红细菌目降低。有国外学者对拟杆菌的益生菌作用进行了研究,发现拟杆菌在帮助宿主分解多糖^[30]、加快肠粘膜血管形成^[31]、免疫系统发育^[32]、维持肠道微生态平衡^[33-34]等方

面发挥着重要的作用。拟杆菌的减少,导致肠道粘膜屏障破坏及通透性增加,肠道细胞和细胞毒素接触增多,引起胃肠道局部及系统炎症反应及氧化应激反应,从而引发肠神经系统中 α -syn 积累,再通过肠-脑轴引发脑黑质神经炎症反应和损伤^[35]。以上提示 A53T 小鼠存在机会致病菌增多而有益菌减少,这与在帕金森病患者的研究结果一致,即转基因小鼠也存在菌群失调。

信号通路预测发现,两组小鼠存在 9 个通路的功能差异,其中相对于野生型小鼠,A53T 转基因小鼠 G 蛋白偶联受体表达下降。G 蛋白偶联受体是细胞信号受体中最大的一个家族,参与多个细胞信号转导过程,能结合细胞周围环境中的化学物质并激活细胞内的一系列信号通路,最终引起细胞状态的改变。2020 年 Khakisahneh 研究小组^[36]证实细菌的代谢产物如短链脂肪酸(SCFA),可作为旁分泌或内分泌因子,通过作用于细胞膜上的 G 蛋白偶联受体,抑制上皮和肠免疫细胞中的组蛋白脱乙酰基酶,调节宿主的能量代谢、上皮屏障免疫等生理过程。SCFA 包括乙酸、丙酸、戊酸和丁酸,均来自结肠中膳食纤维的微生物发酵,是结肠细胞的主要能

源。在对 PD 患者肠道代谢产物研究中发现,PD 患者与正常对照组间短链脂肪酸存在差异^[37]。此外,本研究还发现转基因小鼠类固醇激素合成信号通路表达也下降,有研究表明类固醇激素对大脑发育、认知、记忆、决策及防止抑郁症起着重要作用^[38]。而肠道菌群可以通过不同的降解和活化途径来影响某些激素的水平,例如雄激素和雌激素。研究表明雌激素对小胶质细胞具有抗炎作用,并且由于微生物群落改变而引起的雌激素水平降低似乎会增加认知障碍和慢性炎症^[39]。

综上所述,本研究主要分析了帕金森病转基因小鼠与野生型小鼠肠道菌群结构的差异,结果发现转基因小鼠机会致病菌增多而有益菌减少,表明转基因小鼠存在菌群失调,在应用相关模型时应当予以考虑。同时转基因模型小鼠与野生型小鼠代谢通路存在差异,这将为后期侧重于研究这些代谢通路对帕金森病的影响提供理论依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Mukherjee A, Biswas A, Das SK. Gut dysfunction in Parkinson's disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(25): 5742.
- [2] Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, et al. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2012, 27(6): 709-715.
- [3] Mulak A, Bonaz B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(37): 10609-10620.
- [4] Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2015, 30(10): 1351-1360.
- [5] Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats [J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 128(6): 805-820.
- [6] 赖凤. MPTP 帕金森小鼠模型中的肠道病理和肠道菌群研究 [D]. 重庆:重庆医科大学;2019.
Lai F. Study on intestinal pathology and intestinal flora in MPTP Parkinson's mouse model [D]. Chongqing: Chongqing Medical University; 2019.
- [7] 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 [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 70: 48-60.
- [8] Trigo DI, Del Rey NL, Blesa J. Novel models for Parkinson's disease and their impact on future drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2018, 13(3): 229-239.
- [9] Chesselet MF, Richter F. Modelling of Parkinson's disease in mice [J]. *Lancet Neurol*, 2011, 10(12): 1108-1118.
- [10] Yan L, Yang M, Guo H, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(9): 1131-1139.
- [11] Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration [J]. *J Physiol*, 2017, 595(2): 489-503.
- [12] Ghaisas S, Maher J, Kanthasamy A. Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 158: 52-62.
- [13] Parashar A, Udayabanu M. Gut microbiota: implications in Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2017, 38: 1-7.
- [14] Brenner D, Hiergeist A, Adis C, et al. The fecal microbiome of ALS patients [J]. *Neurobiol Aging*, 2018, 61: 132-137.
- [15] Anhê FF, Nachbar RT, Varin TV, et al. Treatment with camu camu (*Myrciaria dubia*) prevents obesity by altering the gut microbiota and increasing energy expenditure in diet-induced obese mice [J]. *Gut*, 2019, 68(3): 453-464.
- [16] Chambers ES, Preston T, Frost G, et al. Role of gut microbiota-generated short-chain fatty acids in metabolic and cardiovascular health [J]. *Curr Nutr Rep*, 2018, 7(4): 198-206.
- [17] Heintz BA, Pandey U, Wicke T, et al. The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder [J]. *Mov Disord*, 2018, 33(1): 88-98.
- [18] Hopfner F, Künstner A, Müller SH, et al. Gut microbiota in Parkinson disease in a northern German cohort [J]. *Brain Res*, 2017, 1667: 41-45.
- [19] Cassani E, Barichella M, Canello R, et al. Increased urinary indoxyl sulfate (indican): New insights into gut dysbiosis in Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2015, 21(4): 389-393.
- [20] Vizcarra JA, Wilson-Perez HE, Espay AJ. The power in numbers: gut microbiota in Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2014, 30(3): 296-298.
- [21] Malkki H. Parkinson disease: Could gut microbiota influence severity of Parkinson disease? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13(2): 66-67.
- [22] Klingelhoefer L, Reichmann H. The gut and nonmotor symptoms in Parkinson's disease [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2017, 134: 787-809.
- [23] Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, et al. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome [J]. *Mov Disord*, 2017, 32(5): 739-749.
- [24] 韩秋琴, 万国庆, 顾雪锋. 鱼藤酮诱导帕金森病模型小鼠体内肠道微生物的变化 [J]. *解剖学报*, 2020, 51(4): 507-512.

- Han QQ, Wan GQ, Gu XF. Rotenone-induced changes in intestinal microbes in mice with Parkinson's disease [J]. Acta Anat Sin, 2020, 51(4): 507-512.
- [25] 赵程, 于会艳, 李薇, 等. 帕金森病患者肠道菌群变化的研究 [J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(7): 498-503.
- Zhao C, Yu HY, Li W, et al. Study on changes of intestinal flora in patients with Parkinson's disease [J]. Chin J Neurol, 2018, 51(7): 498-503.
- [26] 毕早安. 帕金森病患者肠道菌群分析 [D]. 南京: 南京医科大学; 2018.
- Bi ZA. Analysis of intestinal flora in patients with Parkinson's disease [D]. Nanjing: Nanjing Medical University; 2018.
- [27] Min YW, Rhee P. The role of microbiota on the gut immunology [J]. Clin Ther, 2015, 37(5): 968-975.
- [28] Nair AT, Ramachandran V, Joghee NM, et al. Gut microbiota dysfunction as reliable non-invasive early diagnostic biomarkers in the pathophysiology of Parkinson's disease: a critical review [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2018, 24(1): 30-42.
- [29] Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(7): 2365-2370.
- [30] Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(44): 15718-15723.
- [31] Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JL. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(24): 15451-15455.
- [32] Hooper LV. Bacterial contributions to mammalian gut development [J]. Trends Microbiol, 2004, 12(3): 129-134.
- [33] Sears CL. A dynamic partnership: celebrating our gut flora [J]. Anaerobe, 2005, 11(5): 247-251.
- [34] Hooper LV, Wong MH, Thellin A, et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine [J]. Science, 2001, 291(5505): 881-884.
- [35] 孙根, 朱红灿, 祝清勇. 肠道菌群与帕金森病 [J]. 河南医学研究, 2018, 27(4): 639-641.
- Sun G, Zhu HC, Zhu QY. Intestinal flora and Parkinson's disease [J]. Henan Med Res, 2018, 27(4): 639-641.
- [36] Khakisahneh S, Zhang XY, Nouri Z, et al. Gut microbiota and host thermoregulation in response to ambient temperature fluctuations [J]. Msystems, 2020, 5(5): e00514-20.
- [37] Unger MM, Spiegel J, Dillmann K, et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls [J]. Parkinsonism Relat Disord, 2016, 32: 66-72.
- [38] 汪作为, 方贻儒. 类固醇在精神分裂症病理机制中作用 [J]. 上海精神医学, 2008, 20(5): 313-315.
- Wang Z, Fang YR. The role of steroids in the pathogenesis of schizophrenia [J]. Shanghai Psychiatry, 2008, 20(5): 313-315.
- [39] Needham BD, Kaddurah DR, Mazmanian SK. Gut microbial molecules in behavioural and neurodegenerative conditions [J]. Nat Rev Neurosci, 2020, 21(12): 717-731.

[收稿日期] 2020-11-28