

紫菜联合美多芭的抗帕金森作用 及其对肠道菌群的影响

蒋佳丽¹, 周赛楠², 董晓莉², 张伟³, 王玉明¹, 唐庆娟^{1*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

(2. 香港理工大学香港理工大学应用生物与化学科技学系, 香港 999077) (3. 青岛市立医院, 山东青岛 266011)

摘要: 该研究旨在探讨紫菜联合美多芭的抗帕金森 (Parkinson's Disease, PD) 作用及其对肠道菌群的影响。以 48 只 C57BL/6J 小鼠为研究对象, 随机分为 4 组: 正常对照组、帕金森模型组、美多芭治疗组和紫菜联合美多芭治疗组。以添加 5% (m/m) 紫菜的饲料对 PD 小鼠干预 2 周后, 进行行为学测试、免疫组化分析、免疫印迹分析、炎症因子测定; 利用 Illumina 平台对小鼠肠道细菌的 DNA 片段进行双端测序。结果表明, 相较于单独使用美多芭, 紫菜联合美多芭治疗可以显著改善 PD 小鼠的脑功能, 其中黑质中神经元的数量、酪氨酸羟化酶 (TH) 的表达量分别增加了 46.95%、52.91%, α -突触核蛋白 (α -syn) 的表达量减少了 34.56%; 显著降低了 IL-1 β 的含量, 改善其炎症水平。16S rRNA 结果表明, 紫菜联合美多芭治疗组小鼠肠道菌群的丰富度提升、多样性增加; Firmicutes/Bacteroidota 的比值降低了 71.59%; 与抗炎水平相关的 *Muribaculaceae*、*Akkermansia* 菌属显著富集, 而 *Blautia*、*Helicobacter* 等炎症相关菌属相对丰度明显下降。相较于单独服用美多芭, 紫菜联合治疗后, 其调节肠道菌群、减轻炎症的效果更佳, 抗帕金森作用更显著。

关键词: 帕金森病; 紫菜; 美多芭; 肠道菌群; 神经保护

文章编号: 1673-9078(2023)09-1-9

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.1246

Anti-parkinsonism Effect of Laver Combined with Madopar and Its Effect on the Intestinal Flora

JIANG Jiali¹, ZHOU Sainan², DONG Xiaoli², ZHANG Wei³, WANG Yuming¹, TANG Qingjuan^{1*}

(1.College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

(2.Department of Applied Biology and Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University, Hongkong 999077, China) (3.Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, China)

Abstract: This study aimed to investigate the anti-parkinsonism effect of laver combined with madopar and its influence on the intestinal flora of model mice. Forty-eight C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: normal control, Parkinson's disease (PD) model, madopar treatment, and laver combined with madopar treatment. Mice in the laver combined with madopar treatment group were fed a diet supplemented with 5% laver for 2 weeks. Subsequently, behavioral tests, immunohistochemistry, western blotting, and inflammatory factor level determination were performed to evaluate the brain function of the experimental mice. Paired-end sequencing of intestinal bacterial DNA was conducted on an Illumina platform to monitor changes in the intestinal flora. The results showed that, compared with madopar alone, laver combined with madopar significantly improved the brain function of PD model mice. The number of neurons and expression level of tyrosine hydroxylase in the substantia nigra were 46.95% and 52.91% higher, respectively, while the expression of α -synapse nucleoprotein was 34.56% lower. Serum IL-1 β content was significantly lower, and inflammation was lower. Additionally, 16S rRNA sequencing showed that the richness

引文格式:

蒋佳丽,周赛楠,董晓莉,等.紫菜联合美多芭的抗帕金森作用及其对肠道菌群的影响[J].现代食品科技,2023,39(9):1-9

JIANG Jiali, ZHOU Sainan, DONG Xiaoli, et al. Anti-parkinsonism effect of laver combined with madopar and its effect on the intestinal flora [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 1-9

收稿日期: 2022-09-28

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2019GHY112058)

作者简介: 蒋佳丽 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋食品分子营养学, E-mail: jiangjiali0110@163.com

通讯作者: 唐庆娟 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 海洋食品分子营养学, E-mail: tangqingjuan@ouc.edu.cn

and diversity of the intestinal flora were higher in the laver combined with madopar treatment group than in the madopar alone group. The ratio of Firmicutes/Bacteroidota was 71.59% lower. The relative abundance of *Muribaculaceae* and *Akkermansia*, which are related to anti-inflammation, were significantly enriched, whereas the relative abundances of *Blautia*, *Helicobacter*, and other inflammatory bacteria were significantly decreased. Compared with madopar alone, combined treatment with laver had more positive effects on the composition of the intestinal flora, reduced inflammation, and exerted stronger anti-parkinsonism effects.

Key words: Parkinson's disease; laver; madopar; intestinal microbiota; neuroprotection

帕金森病 (Parkinson's Disease, PD) 是世界范围内, 仅次于阿尔茨海默症的第二大神经退行性疾病。研究表明, 帕金森病多发于老年人, 已成为年龄相关的主要健康问题, 发病率与年龄呈正相关^[1]。PD 病理学的特征是 α -突触核蛋白 (Alpha-synuclein, α -syn) 聚集形成路易体, 沉积在中脑, 黑质致密部中的多巴胺能神经元选择性丧失^[2,3]。德国神经解剖学家 Braak 在死后帕金森病患者的肠神经系统中发现了错误折叠而成的 α -突触核蛋白寡聚体, 并发现帕金森病患者是先发生便秘等胃肠道疾病, 而后才出现帕金森病的运动障碍^[4]。因此, 他提出假设-帕金森病可能起源于肠道。此后, 大量临床研究表明: 肠道菌群组成的改变可能与 PD 的发病机制和临床表型有关^[5]。

1960 年代引入的 PD 治疗药物左旋多巴 (L-DOPA) 为帕金森病的治疗带来了突破^[6]。随着科学的发展, 罗氏公司研发了一种复方左旋多巴制剂-美多芭 (多巴丝肼片); 与单纯左旋多巴相比, 美多芭疗效显著提高, 且副作用明显减少^[7,8]。但是在临床研究发现, 该药起效缓慢^[9]; 随着用药时间延长, 患者会出现剂量依赖、不自主异常动作^[10]。因此, 寻找联合用药材料, 改善其毒副作用、提升治疗效果, 对该病的治疗具有重要意义。

紫菜是我国的一种经济类红藻, 富含蛋白质、维生素、多糖等多种营养物质, 其中紫菜多糖的含量占紫菜干重的 20%~40%, 是紫菜中含量最高的营养成分^[11]。药理学研究表明, 紫菜多糖具有抗肿瘤活性、抗心脑血管疾病、免疫调节活性等多种生理活性^[12-14]。Wang 等^[15]提出, 紫菜多糖可对 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 诱导的细胞毒性产生神经保护作用; 赵婷婷^[16]的研究发现, 经低浓度紫菜多糖处理的 SH-SY5Y 细胞模型, 其神经保护作用明显优于模型组; 同时, 经低浓度紫菜多糖干预的阿尔茨海默症模型小鼠, 其学习记忆能力大有提升。除紫菜多糖的相关研究外, 李小平等^[17]还发现, 从坛紫菜中提取出的叶黄素对神经胶质瘤细胞的增殖具有抑制作用。

Han 等^[18]研究表明, 由于食品成分之间的潜在相互作用, 天然食品产生的生物学效应可能优于天然食品中各个成分的作用之和。因此, 相较于前文所提到

的紫菜多糖、紫菜提取出的叶黄素, 紫菜或许能够起到更加优越的神经保护作用。基于上述研究, 本实验旨在探究紫菜联合美多芭的抗帕金森作用及其对肠道菌群的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

C57BL/6J 小鼠, SPF 级, 雄性, 6 周龄, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司。饲料购于江苏南通特洛菲饲料科技有限公司。

1.1.2 原料与试剂

坛紫菜购于福建远扬藻业股份有限公司。MPTP 购于上海麦克林生化科技有限公司; 美多芭 (多巴丝肼片) 购于上海罗氏制药有限公司; 人白介素-1 β (IL-1 β) 试剂盒购于苏州卡尔文生物科技有限公司; α -syn 抗体购自江苏亲科生物研究中心有限公司; 酪氨酸羟化酶 (TH) 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器

NIKON/Ni-E 电动荧光显微镜, 日本尼康公司; 脱色摇床, Servicebio; SPARK 10M 酶标仪, 瑞士 TECAN; 低温型研磨仪, Servicebio; NovaSeq-6000 测序平台, 美国 Illumina 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养及模型建立

表 1 动物分组及饲料配方

Table 1 Animal grouping and feed formulation

动物分组	饲料配方
正常对照组 (N)	AIN93M 标准棒状饲料
帕金森模型组 (M)	AIN93M 标准棒状饲料
美多芭治疗组 (L)	AIN93M 标准棒状饲料
紫菜联合美多芭治疗组 (P)	AIN93M 标准棒状饲料+5%紫菜

将 48 只小鼠随机均分为 4 组, 分别为正常对照组 (N)、帕金森模型组 (M)、美多芭治疗组 (L)、紫菜联合美多芭治疗组 (P); 饲喂 2 周标准棒状饲料

及添加紫菜的饲料, 分组及饲料配方如表 1 所示。与此同时, N 组与 M 组每天灌胃生理盐水, 其他两组每天灌胃 20 mg/kg (按体质量计) 美多芭。通过一天内腹腔注射四次 20 mg/kg (按体质量计) MPTP, 间隔两小时注射一次, 建立急性 PD 模型^[19]; N 组腹腔注射生理盐水, 其余组均腹腔注射 MPTP。观察小鼠的精神状态、进食及排泄情况、行为活动等, 记录小鼠体温变化、是否出现死亡等情况。最后一次腹腔注射的 12 h 后, 对小鼠进行行为学实验; 48 h 后通过摘眼球取血, 脱颈椎处死小鼠。收集相关的脏器及小鼠肠道内容物并保存于 -80 °C 以便后续检测。PD 急性模型建立成功的标志: 小鼠未出现死亡, 表现出类似于 PD 行动迟缓、运动不协调、便秘等症状。

1.2.2 行为学检测

1.2.2.1 小鼠爬杆实验

参考文献^[20]中所用方法, 进行爬杆试验。通过让小鼠在一根垂直铁杆上由上往下爬, 观察小鼠自身运动的协调性。将一根长约 0.5 m, 直径为 1 cm 的铁棒固定在铁架台上, 并用洁净的无特殊异味的白色纱布均匀缠绕于铁棒上, 固定好铁架台将其放入干净的塑料容器中。在注射 MPTP 之前对小鼠进行爬杆实验训练。训练内容: 将小鼠从笼中取出, 将其头朝下竖直放置在距离铁棒底部 1/3 位置处, 让小鼠自由从上往下爬至铁架台底部; 然后将小鼠放置在铁棒距离底部 2/3 位置处, 将小鼠竖直放置, 让其自由从上往下爬至铁架台底部; 再次将小鼠放置在铁棒最高处, 让其自由从上往下爬至铁架台底部。重复以上操作三次, 训练至小鼠能够自由从铁棒最顶部爬至铁架台底部为止。

在注射 MPTP 后对小鼠进行爬杆实验, 每只小鼠重复至少三次以上, 记录小鼠每次从铁棒顶端到铁架台底部的时间, 并观测小鼠步伐情况, 若小鼠在爬行过程中出现有往反方向爬行的趋势, 则应将小鼠移开铁棒放置笼内休息, 之后重新进行爬杆实验。统计小鼠爬杆数据并进行分析。

1.2.2.2 小鼠悬挂实验

握力的检测同样也是评价小鼠运动协调能力的一种常见的检测手段^[20]。将一根细绳系于两支竖直放置的铁棒之间, 固定好细绳。在进行正式实验前对小鼠进行适应性训练, 步骤如下: 将小鼠自由放置在细绳中部, 使其前爪能够稳定抓住细绳后松开, 让其自由悬挂在细绳上, 以 1 min 为悬挂实验的上限时间, 重复此操作三次以上。

小鼠注射 MPTP 后, 进行悬挂实验, 将其自由放置在细绳中央, 让小鼠前爪紧握住细绳后松开, 记录在细绳上悬挂的时间, 至少重复三次以上, 统计数据

并分析。

1.2.3 炎症因子 IL-1 β 水平检测

采用 ELISA 试剂盒检测各组小鼠血清中 IL-1 β 的水平, 在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

1.2.4 免疫组化分析

每组随机选择 3 只小鼠, 快速取其全脑并置于 4% (m/V) 多聚甲醛固定液中; 取出固定后的脑组织, 经石蜡包埋处理后, 进行连续切割, 得到厚度约为 20 μ m 的切片; 对制得的切片进行脱蜡水化和抗原修复处理, 而后滴加 TH 抗体, 4 °C 孵育过夜; 第 2 天用 PBS 缓冲液进行冲洗, 待切片表面的液体晾干后, 滴加 HRP 标记的二抗, 于室温孵育 50~60 min; PBS 缓冲液冲洗后, 滴加 DAB 溶液显色, 复染细胞核, 脱水封片。利用电动荧光显微镜进行观察, 采用 IPP6.0 图像分析软件统计 TH 阳性细胞面积。

1.2.5 Western Blot 检测黑质中 TH、 α -syn 水平

向 4 °C PBS 缓冲液漂洗后的中脑组织中, 加入 RIPA 蛋白裂解液 (含 PMSF、磷酸酶抑制剂), 利用组织破碎仪 (60 Hz, 60 s, 4 次) 快速匀浆至充分裂解; 将裂解液离心 (12 000 r/min, 4 °C, 10 min), 取上清。采用 BCA 法测定蛋白浓度。

制备聚丙烯酰胺凝胶体系, 依次上样, 进行电泳。电泳结束后, 取出胶体, 进行半干法转膜; 将 PVDF 膜置于 5% (V/V) 脱脂牛奶中封闭 2 h; TBST 洗涤后, 加入一抗 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤后, 加入二抗 (1:1 000), 室温孵育 2 h; TBST 洗涤。采用 ECL 化学发光法显影, 使用 Image J 分析蛋白条带灰度值。

1.2.6 肠道菌群 16S rRNA 测序分析

以小鼠结肠内容物为样本, 提取微生物 DNA。本项目采用 Illumina-NovaSeq-6000 平台对群落 DNA 片段进行双端 (Paired-end) 测序。

1.3 数据分析

实验数据以 (Mean $\pm$ SEM) 表示, 数据显著性分析采用 GraphPad (8.3.0) 软件进行单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 小鼠饲养状态

饲养初期, 小鼠因每天进行灌胃, 曾出现短期不适应, 状态稍显不佳, 几天之后状态恢复正常。在摄入受试物的同时, 灌胃阳性药物, 两周后给予小鼠腹腔注射 MPTP, 小鼠出现行动迟缓、目光呆滞, 毛发缺少光泽, 体温下降, M 组中这些症状表现尤为明显。

2.2 行为学影响

2.2.1 小鼠爬杆实验

小鼠爬杆实验结果如图 1a 所示, 由图 1 可知, 注射 MPTP 进行造模后, M 组 PD 小鼠的爬杆时间显著多于 N 组正常小鼠 ($P<0.01$), 运动能力显著减弱。在整个爬杆过程中, 除了正常组以外, 其余各组中均有部分小鼠出现停滞不前的状况。经美多芭干预的 L 组、P 组 PD 小鼠, 其运动能力强于 M 组, 爬杆速度高于未经治疗的 M 组小鼠; 此外, P 组小鼠运动能力更强 ($P<0.05$)。

2.2.2 小鼠悬挂实验

如图 1b 所示, 相较于 N 组正常小鼠, M 组 PD 小鼠的悬挂时间显著减少 ($P<0.05$), 平衡能力减弱。相较于 M 组 PD 小鼠, L 组、P 组小鼠悬挂实验时间均有所增加, 表明经美多芭干预后的 PD 小鼠, 其平衡能力有所增强; 尤其是 P 组, 其悬挂时间最长, 平衡能力显著强于 M 组 ($P<0.05$)。

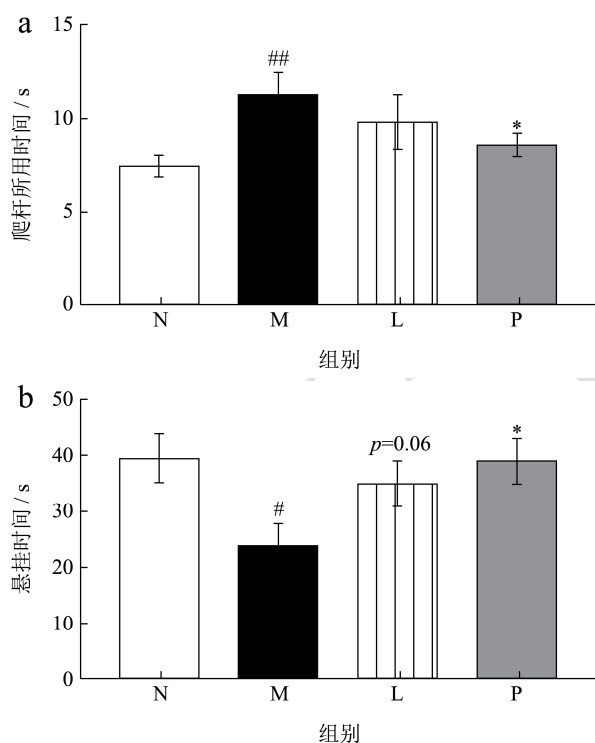


图1 小鼠行为学实验结果

Fig.1 Experimental results of mouse behavior

注: a: 爬杆实验; b: 悬挂实验。与正常与相比, #表示差异显著 ($P<0.05$), ##表示差异极显著 ($P<0.01$); 与模型组相比, *表示差异显著 ($P<0.05$); 图 2b、3b 同。

2.3 免疫组化分析

TH 可催化酪氨酸生成左旋多巴, 是合成神经递质多巴胺的关键步骤, 因此 TH 的表达能较为直观地

反映帕金森病的发展进程^[21]。如图 2a 所示, N 组小鼠黑质部位中的 TH 阳性细胞排布紧密, 数量最多, 呈染色较深的粗条带状; M 组帕金森小鼠黑质部位中的 TH 阳性细胞的数量较对照组显著减少 ($P<0.05$), 且排布稀疏, 染色较浅; 给予阳性药物美多芭进行治疗后, 有增加 TH 阳性细胞数量的趋势, 但并无显著性; 与 M 组 PD 小鼠相比, P 组显著增加了 PD 小鼠中脑黑质部位 TH 阳性细胞的数量 ($P<0.05$), 细胞排布较为紧密, 细胞染色程度也高。结果表明: 紫菜联合美多芭的治疗方法对神经元的保护作用, 优于单独使用阳性药物美多芭。

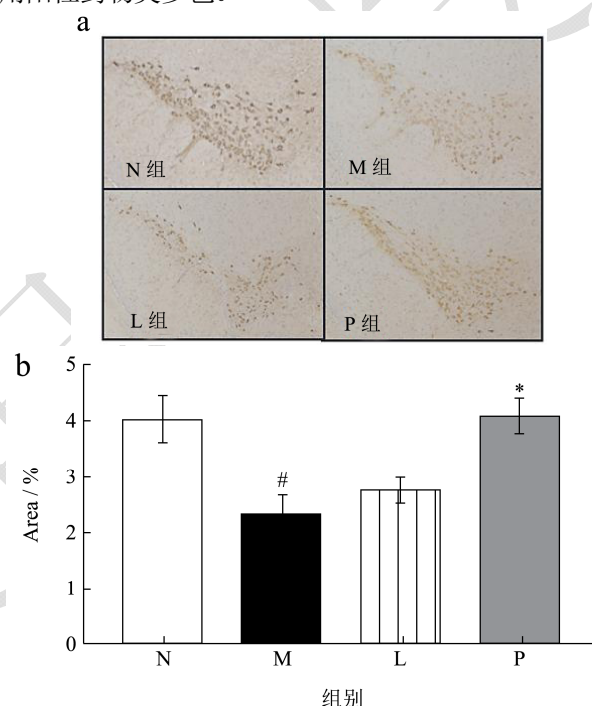


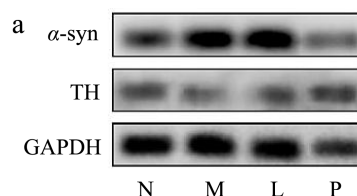
图2 小鼠脑组织免疫组化结果

Fig.2 Immunohistochemical results of mouse brain tissue

注: a: 免疫组织化学图像; b: 酪氨酸羟化酶阳性细胞所占面积。

2.4 Western Blot 测定黑质中 α -syn、TH 水平

Western Blot 结果表明, M 组 PD 小鼠黑质中 α -syn 含量显著高于 N 组正常小鼠 ($P<0.05$), TH 含量低于 N 组正常小鼠, 符合帕金森病人的病理性特征。L 组、P 组的 α -syn 含量低于 M 组, TH 含量高于 M 组, 且 P 组的变化更为显著 ($P<0.05$)。综上可知, 紫菜联合美多芭治疗的效果优于单独使用阳性药物美多芭。



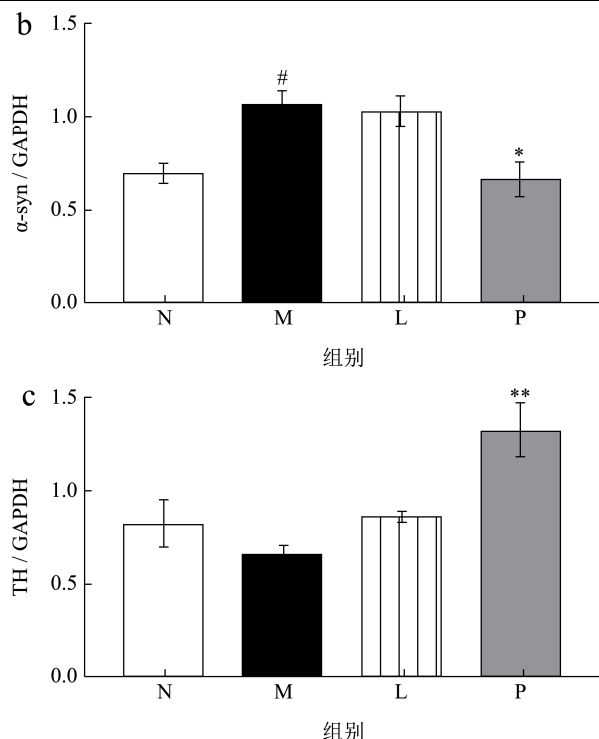


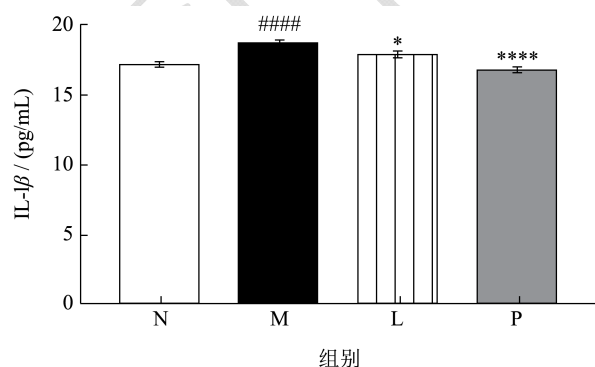
图3 小鼠黑质部位 Western Blot 结果

Fig.3 Western Blot of the substantia nigra of mice

注: a: α -syn 及 TH 在小鼠黑质中的蛋白表达; b: 黑质中 α -syn 水平的定量分析; c: 黑质中 TH 水平的定量分析。与模型组相比, **表示差异显著 ($P < 0.01$)。

2.5 IL-1 β 水平的检测

小鼠血清中 IL-1 β 水平如图 4 所示。M 组的 IL-1 β 含量显著增加, 与 N 组相比有统计学差异 ($P < 0.0001$), 表明帕金森病会导致小鼠炎症水平升高; 给予阳性药物美多芭进行治疗, 或给予紫菜进行联合治疗, 均能降低 PD 小鼠血清中 IL-1 β 含量; 此外, 紫菜联合美多芭治疗的效果明显优于单独使用阳性药物美多芭 ($P < 0.0001$)。

图4 小鼠血清炎症因子 IL-1 β 含量Fig.4 Serum levels of inflammatory cytokines IL-1 β in mice

注: 与正常组比较, ####差异高度显著 ($P < 0.0001$); 与模型组比较, *差异显著 ($P < 0.05$); ****差异高度显著 ($P < 0.0001$)。

2.6 肠道菌群分析

2.6.1 在门水平上的菌群丰度及差异

基于门水平对菌群组成进行分析可知, 各组中厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidota) 和放线菌门 (Actinobacteria) 为主要优势菌门, 其相对丰度之和达 80% 以上。与 M 组相比, P 组小鼠肠道中的 Firmicutes 由 44.96% 减少到 38.08%, Bacteroidota 由 17.01% 增加到 50.88%, Firmicutes/Bacteroidota 的比值由 2.64 降低至 0.75, 降低了 71.59%; 该结果表明, 紫菜联合美多芭的治疗对 Firmicutes/Bacteroidota 有正向调节作用, 有助于维持肠道稳态; 并可以通过增加 Bacteroidota, 来改善 PD 小鼠的炎症水平^[22]。Actinobacteria 由 20.26% 减少到 1.41%, 其趋势符合 PD 患者的菌群变化, 与 Li 等^[23]的研究一致。

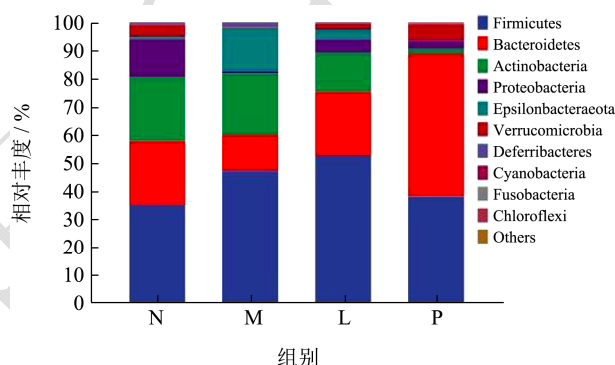


图5 小鼠肠道菌群门水平的物种组成分析

Fig.5 Analysis of phylum level species composition of intestinal microbiota in mice

2.6.2 在属水平上的菌群丰度及差异

在属水平上, 与 N 组正常小鼠比较, M 组 PD 小鼠中的乳杆菌属 *Lactobacillus*、与抗炎水平相关的 *Muribaculaceae*、杜氏杆菌属 *Dubosiella* 的相对丰度分别降低了 5.12%、10.06%、6.75%; *Coriobacteriaceae*、*UGG-002*、布劳特氏菌 *Blautia*、幽门螺杆菌属 *Helicobacter* 等肠道炎症相关菌属的相对丰度有所升高^[24,25], 表明 M 组小鼠的菌群结构易引起肠道炎症。

经美多芭干预后, PD 小鼠肠道内的 *Muribaculaceae*、杜氏杆菌属 *Dubosiella*、*Allobaculum* 的相对丰度分别升高了 6.83%、1.56%、0.89%; *Helicobacter* 的相对丰度降低 7.91%。经紫菜联合美多芭治疗后, 小鼠肠道内 *Muribaculaceae*、杜氏杆菌属 *Dubosiella*、拟杆菌属 *Bacteroides*、*Allobaculum*、阿克曼氏菌属 *Akkermansia* 的相对丰度分别升高 10.71%、10.51%、15.83%、2.10%, *Coriobacteriaceae*、*UGG-002*、*Blautia*、*Helicobacter* 的相对丰度分别降低 3.59%、3.29%、10.22%。与单独服用美多芭相比, 紫菜联合

治疗的菌群调节作用更佳, 有益菌属相对丰度增加的多, 炎症相关有害菌属相对丰度减少的多。

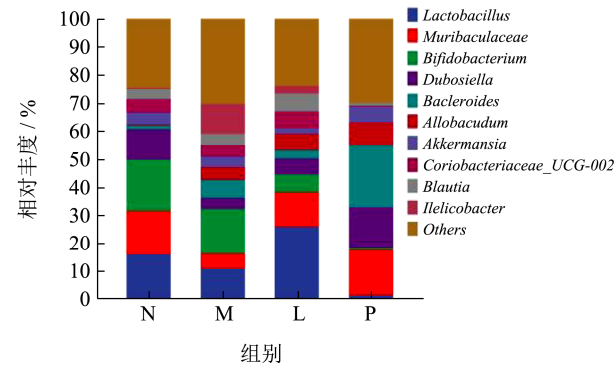


图 6 小鼠肠道菌群属水平的物种组成分析

Fig.6 Analysis of genus level species composition of intestinal microbiota in mice

2.6.3 菌群多样性分析

各组小鼠的 Alpha 多样性指数如图 7a 所示。相比于 N 组正常小鼠, M 组 PD 小鼠的 Observed species 指数、Shannon 指数、Simpson 指数均有显著变化 ($P<0.05$), 表明 PD 小鼠肠道菌群的丰富度及多样性均低于正常小鼠; P 组小鼠的各项指数均显著高于 M 组 PD 小鼠 ($P<0.01$), 表明经紫菜联合治疗的小鼠, 其肠道菌群结构发生了一定程度的改变, 菌群的丰富度及多样性均高于 PD 小鼠。此外, P 组小鼠的菌群丰富度显著高于 L 组 ($P<0.05$), 表明相较于单独服用美多芭, 紫菜联合治疗调整 PD 小鼠肠道菌群结构的效果更佳。

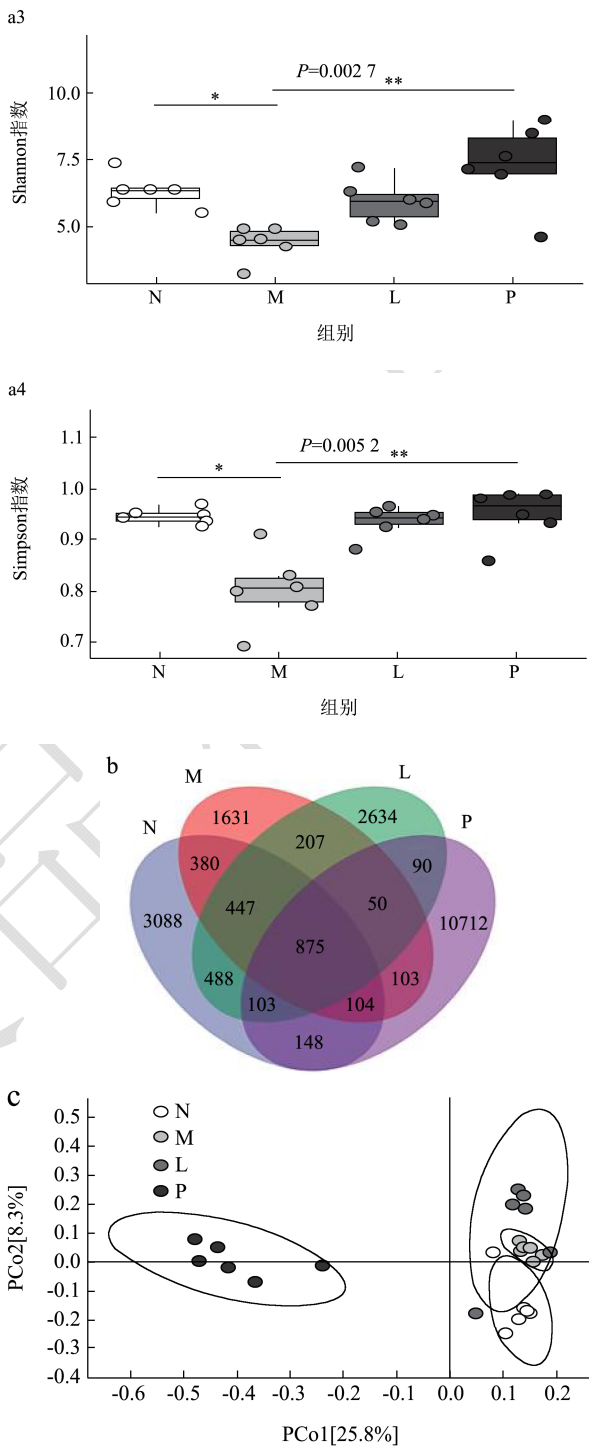
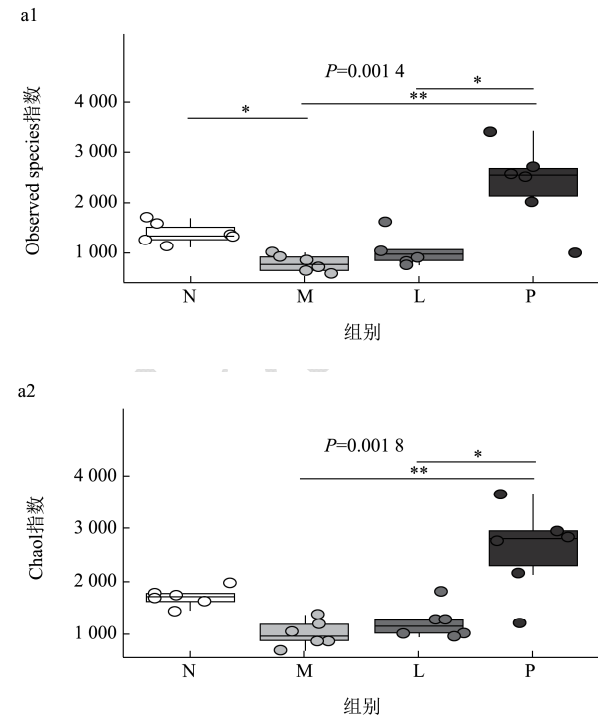


图 7 菌群多样性分析

Fig.7 Analysis of bacterial diversity

注: a: Alpha 多样性指数; b: 韦恩图; c: Beta 多样性。

韦恩图可用于统计不同组别共有和独有的 OTU 数量, 由图 7b 可知: N 组独有 OTU 数量为 3 088 个, M 组为 1 631 个, 其 OTU 数远低于 N 组; L 组、P 组 OTU 数分别为 2 634、10 712, 均显著高于 M 组; 值得注意的是, P 组 OTU 数量为四组中最高, 即 P 组菌群多样性最高。

在 OTU 水平, 对小鼠肠道菌群进行 PCoA 分析, 各组菌群多样性均有明显的聚类现象, 结果如图 7c 所示。N 组与 M 组样本能明显分开; L 组、P 组的样本与 M 组样本距离较远, 表明 PD 小鼠肠道菌群结构发生了较大程度的变化, 与 M 组有显著差异。此外, 与 L 组相比, P 组与 M 组的距离更远, 说明在紫菜联合美多芭的治疗下, PD 小鼠肠道菌群结构存在明显差异。

2.6.4 LEfSe 菌群差异分析结果

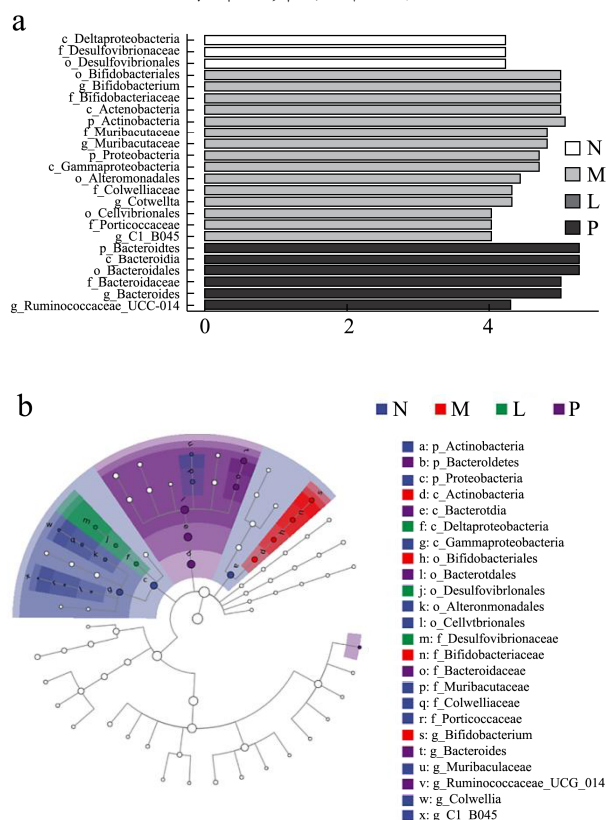


图8 LEfSe 菌群差异分析

Fig.8 LEfSe microbiota difference analysis

注: a: LDA 值分布柱状图; b: 进化分支图。

不同组中丰度差异显著的物种如图所示。结果显示, 各组小鼠结肠菌群差异显著。N 组小鼠, 以放线菌门 Actinobacteria、交替单胞菌目 Alteromonadales、Muribaculaceae 菌属等菌群的相对丰度较高; M 组 PD 小鼠, 以双歧杆菌属 Bifidobacterium 的相对丰度较高, 与 Erin 等^[26]的临床研究结果一致。L 组小鼠中, 脱硫弧菌科 Desulfovibrionaceae 显著富集; 在 P 组小鼠中, 拟杆菌门 Bacteroidetes、瘤胃菌属 Ruminococcaceae 等有益菌显著富集。

3 讨论

本研究采用 C57BL/6J 小鼠构建 PD 急性模型, 经过 MPTP 处理后, 小鼠明显状态不佳, 行动迟缓、目光呆滞, 毛发缺少光泽, 运动能力及平衡能力下降。

经处死后取材、分析得知, M 组 PD 小鼠血清中的炎症因子 IL-1 β 含量升高, 黑质中多巴胺能神经元减少, 催化自身合成左旋多巴胺的 TH 含量减少; α -syn 含量增加、 α -syn 异常折叠的几率显著增加, 表明 MPTP 造模成功。P 组小鼠的运动及平衡能力显著优于 M 组 PD 小鼠, 炎症水平显著低于 M 组, 黑质中多巴胺能神经元数量显著多于 M 组, TH 蛋白表达量均明显高于 M 组, α -syn 蛋白表达量显著低于 M 组。此外, P 组的上述指标也均优于 L 组。综上所述, 紫菜联合美多芭治疗能够显著改善 PD 小鼠的脑功能, 表明紫菜联合美多芭的疗效显著, 且优于单独服用美多芭。

由 16S rRNA 测序结果可知, M 组 PD 小鼠结肠内菌群 OTU 数量显著减少, 结构紊乱, 其丰富度与多样性均低于 N 组正常小鼠; 而紫菜联合美多芭治疗可以起到明显的调节作用, 菌群丰富度与多样性都有显著增强。M 组中拟杆菌门 Bacteroidetes 相对丰度低, 与 Marcus^[27]的临床研究结果一致; Blautia、Helicobacter 等肠道炎症相关菌属的相对丰度高, 表明 M 组小鼠的菌群结构易引起肠道炎症。P 组中, 与抗炎水平相关的 Muribaculaceae、Dubosiella、Bacteroides、Allobaculum、Akkermansia 的相对丰度升高, 提示经紫菜联合美多芭治疗可降低 PD 小鼠炎症水平, 与实验中测得的血清中 IL-1 β 水平一致; 此外, 能够稳定肠道屏障的 Ruminococcaceae 也在 P 组中显著富集, 提示紫菜联合美多芭治疗可减轻 MPTP 对小鼠肠屏障的损伤。

多项研究表明, 肠道菌群失衡引起的肠道炎症, 最终会导致 PD 的形成。相关研究^[28-30]提出, 肠道内的炎症因子会增加肠道通透性、损伤血脑屏障, 加速 α -syn 双向运输进入大脑的速度, 继而导致脑部 α -syn 错误折叠的开始。Ruth 等^[31]提出, 某些特定的促炎因子不仅会导致胃肠道疾病的发生, 还会进一步引起脑部炎症和多巴胺能神经元的死亡, 并最终导致帕金森病。

综上所述, 紫菜联合美多芭治疗能够显著调节 PD 小鼠肠道菌群的结构, 其神经保护作用可能是通过减少产生促炎因子的病原菌的相对丰度、增加抗炎菌属的相对丰度, 以降低 PD 小鼠体内的炎症水平, 避免脑部 α -syn 的异常折叠及多巴胺能神经元的丧失。

4 结论

通过本研究发现帕金森病使得正常小鼠的肠道菌群发生显著变化: 肠道菌群多样性及丰富度降低, Lactobacillus、Muribaculaceae、Dubosiella 的相对丰度分别降低了 5.12%、10.06%、6.75%。紫菜联合美多芭干预 PD 小鼠后, Muribaculaceae、Dubosiella、Bacteroides、Allobaculum、Akkermansia 的相对丰度分

别升高 10.71%、10.51%、15.83%、2.10%；黑质中神经元的数量、TH 的表达量分别增加了 46.95%、52.91%， α -syn 的表达量减少了 34.56%。

综上所述，本文探讨了紫菜联合美多芭的抗帕金森作用及其对肠道菌群的影响。结果表明，在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型中，紫菜联合美多芭可调节肠道菌群结构，且其抗帕金森作用优于单独使用美多芭。本文为紫菜的精深加工、功能性食品的开发提供了一定的理论基础；同时，为 PD 的临床治疗提供了新思路。

参考文献

- [1] Hirsch L, Jette N, Frolkis A, et al. The incidence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis [J]. *Neuroepidemiology*, 2016, 46(4): 292-300.
- [2] Irwin D J, Grossman M, Weintraub D, et al. Neuropathological and genetic correlates of survival and dementia onset in synucleinopathies: A retrospective analysis [J]. *The Lancet Neurology*, 2017, 16(1): 55-65.
- [3] Uemura N, Yagi H, Uemura M T, et al. Inoculation of alpha-synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve [J]. *Mol Neurodegener*, 2018, 13(1): 21.
- [4] Braak H, Del Tredici K, Rüb U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease [J]. *Neurobiology of Aging*, 2003, 24(2): 197-211.
- [5] Filip S, Velma A, Pereira P A B, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype [J]. *Movement Disorders*, 2015, 30(3): 350-358.
- [6] Katzenschlager R, Lees A J. Treatment of Parkinson's disease: Levodopa as the first choice [J]. *J Neurol*, 2002, 249(Suppl 2): II19-24.
- [7] 李娅宁,耿磊,程丽萍.帕金森病的常用治疗药物分析[J].山东医学高等专科学校学报,2020,42(5):361-362.
- [8] 苏红军.帕金森病药物治疗的研究进展[J].继续医学教育, 2020,34(2):148-151.
- [9] 章东元.归芍柔筋汤联合美多芭治疗帕金森病临床观察[J].中国中医药现代远程教育,2019,17(24):68-69,81.
- [10] Ye T, Bartlett M J, Sherman S J, et al. Spectral signatures of L-DOPA-induced dyskinesia depend on L-DOPA dose and are suppressed by ketamine [J]. *Exp Neurol*, 2021, 340: 113670.
- [11] 张忠山,王晓梅,刘重斌,等.不同采收期坛紫菜中半乳聚糖硫酸酯的结构特征分析[J].湖州师范学院学报,2020,42(4): 41-45.
- [12] 张忠山,王晓梅,毛根祥,等.紫菜半乳聚糖结构与生物活性研究进展[J].食品工业科技,2019,40(11):342-350.
- [13] 刘亮,钟云凯,曹少谦,等.紫菜多糖抗氧化活性及体外免疫调节作用研究[J].核农学报,2016,30(12):2355-2362.
- [14] 谢好贵,韦明钎,陈美珍,等.3 种多糖复合体外抗肿瘤协同增效作用[J].食品科学,2013,34(15):289-294.
- [15] Wang W, Song N, Jia F, et al. Neuroprotective effects of porphyrin derivatives against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity is independent on mitochondria restoration [J]. *Ann Transl Med*, 2015, 3(3): 39.
- [16] 赵婷婷.不同分子量坛紫菜多糖的制备及其抗衰老活性研究[D].青岛:中国科学院研究生院(海洋研究所),2007.
- [17] 李小平,闫忠辉,别雨薇,等.坛紫菜中化学成分的提取及抗脑胶质瘤活性组分的筛选[J].中药药理与临床,2018,34(5): 81-85.
- [18] Han Y, Xiao H. Whole food-based approaches to modulating gut microbiota and associated diseases [J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2020, 11: 119-143.
- [19] 苑晓阳,刘俊骞,顾平,等.艾司西酞普兰对 MPTP 诱导的急性帕金森病模型小鼠运动和认知功能的作用[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2020,27(6):460-465.
- [20] Huang D, Wang Z, Tong J, et al. Long-term changes in the nigrostriatal pathway in the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. *Neuroscience*, 2018, 369: 303-313.
- [21] 陈世坚,李舸,张钰,等.MPTP 诱导帕金森病小鼠亚急性与慢性模型的比较及评价[J].中国组织工程研究,2022,26(8): 1247-1252.
- [22] 何曦萌.针灸“足三里”对高尿酸血症小鼠肠道菌群及血清尿酸、IL-10、TNF- α 的影响研究[D].成都:成都中医药大学,2021.
- [23] Li Zhuo, Lu Gang, Li Zhe, et al. Altered actinobacteria and firmicutes phylum associated epitopes in patients with Parkinson's disease [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 632482.
- [24] Bolte Laura A, Vich Vila Arnau, Imhann Floris, et al. Long-term dietary patterns are associated with pro-inflammatory and anti-inflammatory features of the gut microbiome [J]. *Gut*, 2021, 70(7): 1287-1298.
- [25] Guo Y, Zhang Y, Gerhard M, et al. Effect of *Helicobacter pylori* on gastrointestinal microbiota: A population-based study in Linqiu, a high-risk area of gastric cancer [J]. *Gut*, 2020, 69(9): 1598-1607.
- [26] Hill-Burns Erin M, Debelius Justine W, Morton James T, et al. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome [J]. *Movement*

- Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society, 2017, 32(5): 739-749.
- [27] Marcus M Unger, Jörg Spiegel, Klaus-Ulrich Dillmann, et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls [J]. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2016, 32: 66-72.
- [28] Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, et al. Colonic inflammation in Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 50: 42-48.
- [29] Sui Y T, Bullock K M, Erickson M A, et al. Alpha synuclein is transported into and out of the brain by the blood-brain barrier [J]. *Peptides*, 2014, 62: 197-202.
- [30] Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice [J]. *Science Translational Medicine*, 2014, 6(263): 158.
- [31] Villaran R F, Espinosa-oliva A M, Sarmiento M, et al. Ulcerative colitis exacerbates lipopolysaccharide-induced damage to the nigral dopaminergic system: potential risk factor in Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2010, 114(6): 1687-1700.