



口服硫酸链霉素对帕金森小鼠症状的改善及其对肠道菌群的影响

安云英¹, 吴敏娜^{1*}, 李璞泽¹, 靖昕瑞¹, 张剑锋¹, 薛红飞¹, 邓保国¹, 钟根深²

¹新乡医学院基础医学院, 河南 新乡 453003

²新乡医学院医学检验学院, 河南 新乡 453003

摘要:【目的】探讨硫酸链霉素对慢性帕金森病(Parkinson's disease, PD)小鼠症状的改善及肠道菌群的影响。【方法】将 40 只 C57BL/6 小鼠分为正常对照组、硫酸链霉素对照组、帕金森病模型组和硫酸链霉素干预帕金森病模型组。帕金森病模型组在实验的前 5 周采用 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, 25 mg/kg)和丙磺舒(250 mg/kg)联合诱导帕金森病模型;硫酸链霉素干预帕金森病模型组在模型构建的同时连续饮用链霉素水溶液(500 μg/mL)至实验第 8 周末。综合运用转棒实验、爬杆实验、免疫组织化学、荧光定量 PCR、高通量测序等多种实验方法,检测各组实验小鼠相关症状与指标。【结果】慢性 PD 模型小鼠与正常对照小鼠相比,表现出极显著的运动障碍($P<0.01$),脑黑质纹状体中多巴胺(Dopamine, DA)能神经元及其纤维极显著减少($P<0.01$),肠道出现显著的功能紊乱和炎症,同时肠道菌群结构发生了显著的变化:厚壁菌门/拟杆菌门(*Firmicutes/Bacteroidetes*, F/B)比值升高,疣微菌科(*Ruminococcaceae*)丰度极显著增加($P<0.01$),普雷沃氏菌科(*Prevotellaceae*)及 *Prevotellaceae*_UCG-001 丰度极显著降低($P<0.01$)。硫酸链霉素干预显著提高慢性 PD 小鼠的运动能力($P<0.05$),缓解脑黑质纹状体系统中 DA 能神经元及其纤维的减少($P<0.05$),改善肠道功能障碍和肠道炎症,同时可降低 F/B 的比值,显著降低 *Ruminococcaceae*、理研菌科(*Rikenellaceae*)和乳杆菌科(*Lactobacillaceae*)的丰度,增加 *Prevotellaceae* 和 *Prevotellaceae*_UCG-001 的丰度。【结论】硫酸链霉素可改善 PD 小鼠相关症状,且影响了 PD 小鼠的肠道菌群结构。

关键词: 肠道菌群, 硫酸链霉素, 帕金森病, 炎症

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种多发于中老年人的神经退行性疾病,且患病率呈现随年龄增长而升高的趋势^[1-2]。PD 的病理特征为黑质多巴胺(dopamine, DA)能神经元的选择性丧失和

基金项目:国家自然科学基金(81872361);新乡医学院精神神经医学学科群支持计划(2016PN-KFKT-12);河南省神经修复重点实验室开课题(HNSJXF-2016-012)

*通信作者。E-mail: minnawu@xxmu.edu.cn

收稿日期: 2018-09-06; 修回日期: 2018-12-29; 网络出版日期: 2019-02-13

纹状体 DA 能神经纤维的减少^[3]。PD 发病机制尚未完全明了, 目前认为氧化应激是其主要的发病机制。近来越来越多的研究表明肠道菌群参与了 PD 的发生发展。Scheperjans 等研究发现 PD 患者的普雷沃氏菌科(*Prevotellaceae*)丰度水平较健康对照下降了 77.6%, 且肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)的丰度与 PD 的运动症状相关联^[4]; Qian 等探讨了中国 PD 患者的粪便微生物组成, 发现 PD 患者粪便中富集了梭菌属 IV (*Clostridium* IV)、水生杆菌属(*Aquabacterium*)、霍乱嗜热菌属(*Holdemanella*)等, 此外还发现埃希菌属/志贺菌属比值(*Escherichia/Shigella*)与疾病持续时间呈负相关, *Butyricoccus* 和梭菌属 XIVb (*Clostridium* XIVb)与认知障碍有关^[5]。DA 对调节运动和认知功能至关重要, 而负责将酪氨酸转化为 DA 的酪氨酸羟化酶和多巴脱羧酶的合成由微生物-脑-肠轴控制^[6], 亦表明肠道菌群与 PD 的发生发展密切相关。

口服抗生素可通过微生物-脑-肠轴作用于中枢神经系统。溶血性链球菌 M 抗原可导致中枢多巴胺能系统的功能障碍, 氨基青霉素可防治暴露于该 M 抗原动物的运动和进行障碍, 而这种神经保护潜力可能是通过调节肠道菌群发挥作用的^[7]。米诺环素在 PD 中具有神经保护作用^[8-10], 且其具有通过降低 *Firmicutes/Bacteroidetes* 比值来重新平衡肠道菌群的能力^[11], 因此米诺环素对 PD 的保护作用亦可能是与其对肠道菌群的调节有关。然而, 目前关于抗生素是否可通过肠道菌群调节中枢神经系统的研究较少, 有待于进一步深入探讨。

高浓度的抗生素混合物(氨基青霉素 1 g/L, 万古霉素 0.5 g/L, 新霉素 0.5 g/L, 庆大霉素 100 mg/L, 红霉素 10 mg/L, 自由饮用)对 PD 小鼠进行治疗(从

5-6 周龄至 12-13 周龄), 小鼠的病情得到了缓解; 该治疗主要是通过影响肠道菌群发挥作用的, 但长期、高强度的抗生素治疗显然是不明智的, 会导致其他免疫器官和代谢功能的紊乱^[12]。硫酸链霉素(streptomycin sulfate, STR)属氨基糖苷类抗生素, 口服吸收不良, 故常肌内注射; 利用其在肠道吸收极少的特性, 硫酸链霉素常被用于干扰肠道菌群进行其他研究, 如金葡菌在胃肠道定植、伤寒沙门菌对肠道的感染等。另有报道指出用链霉素水溶液(150、300、450 mg/L, 自由饮用)处理 C57BL/6 小鼠 2 d, 并没有显著改变肠道总细菌的丰度, 而是导致了细菌群落结构的变化^[13]。鉴于硫酸链霉素的特性以及肠道菌群与 PD 发生的密切关系, 我们考虑是否可以应用硫酸链霉素调节 PD 小鼠的肠道菌群, 从而缓解 PD 的症状, 因此进行了以下实验: 采用 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)和丙磺舒(probenecid, P)联合用药作用于 C57BL/6 成年小鼠, 建立慢性 PD 模型^[14], 同时自由饮用硫酸链霉素水溶液(500 μ g/mL), 分析硫酸链霉素对肠道菌群的影响以及对 PD 小鼠症状的改善。

1 材料和方法

1.1 实验动物与主要试剂

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 40 只, 9 周龄, 体重(22-25) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】。饲养条件: 室温 23 \pm 2 $^{\circ}$ C, 湿度 55% \pm 5%, 12 h 明暗交替, 自由饮水和摄食。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP, Sigma 公司); 丙磺舒、硫酸链霉素(大连美伦生物技术有限公司); 酪氨酸羟化酶抗体

(Abcam 公司); 兔 SP 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, SP-9001); 革兰阴性菌脂多糖检测试剂盒(北京金山川科技发展有限公司); 反转录、荧光定量试剂盒等分子生物学相关试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司; 其余试剂为分析纯品。

1.2 小鼠疾病模型构建及给药

40 只 9 周龄 C57BL/6 雄性小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为四组(表 1): 正常对照组(CK)、帕金森病模型组(PD)、硫酸链霉素对照组(STR)和硫酸链霉素干预帕金森病模型组(PD_STR)。慢性 PD 模型构建与给药(图 1)如下: PD 组腹腔注射丙磺舒(12.5 mg/mL, 20 mL/kg 小鼠体重), 30 min 后皮下注射 MPTP (2.5 mg/mL, 10 mL/kg 小鼠体重), 自由饮用无菌纯净水; CK 组腹腔注射丙磺舒, 30 min 后皮下注射与 MPTP 等量的生理盐水, 自由饮用无菌纯净水; STR 组腹腔注射丙磺舒, 30 min 后皮下注射与 MPTP 等量的生理盐水, 自由饮用硫酸链霉素水溶液(500 μ g/mL); PD_STR 组腹腔注射丙磺舒, 30 min 后皮下注射 MPTP, 自由饮用硫酸链霉素水溶液(500 μ g/mL)。构造 PD 模型期间丙磺舒和 MPTP 每间隔 3.5 d 注射 1 次, 共 10 次, 造模结束后, STR 和 PD_STR 组继续自由饮用硫酸链霉素水溶液 3 周。

1.3 行为学测定

在实验第 5 周末(第 36–37 天)和 8 周末(第 57–58 天), 通过转棒和爬杆实验进行小鼠神经行为学测试(图 1-B)。转棒实验参照 Petroske 等^[15]的方法, 略作修改: 共 7 个递增的旋转速度(8、10、12、16、20、23、25 r/min), 每个速度的测量时间为 150 s, 每 2 个转速之间间隔至少 10 min, 以减轻小鼠所受的压力与疲劳。以转速为横坐标, 以动物在转棒上停留的时间为纵坐标作图, 计算每只动物累积的行为学活性得分, 并转化成曲线下面积(area under curve, AUC)进行统计学分析。爬杆实验参照 Heng 等^[16]的方法, 适应训练后, 测试小鼠自杆顶爬至杆底部后肢着地的总时间(T-total), 测试 3 次, 每次间隔至少 10 min, 如果小鼠出现中途停顿或反向攀爬, 则重新测试。

表 1. 小鼠分组及给药

Table 1. Mice grouping and processing

Groups	CK	STR	PD	PD_STR
p.o.	Sterile water	STR (500 μ g/mL)	Sterile water	STR (500 μ g/mL)
i.p.	Probenecid	Probenecid	Probenecid	Probenecid
s.c.	NS	NS	MPTP	MPTP

CK: control group; STR: STR treated group; PD: MPTP/p induced Parkinson's disease model mice; PD_STR: STR treated PD model mice. p.o.: oral, i.p.: intraperitoneal injection; s.c.: subcutaneous injection, $n=10$.

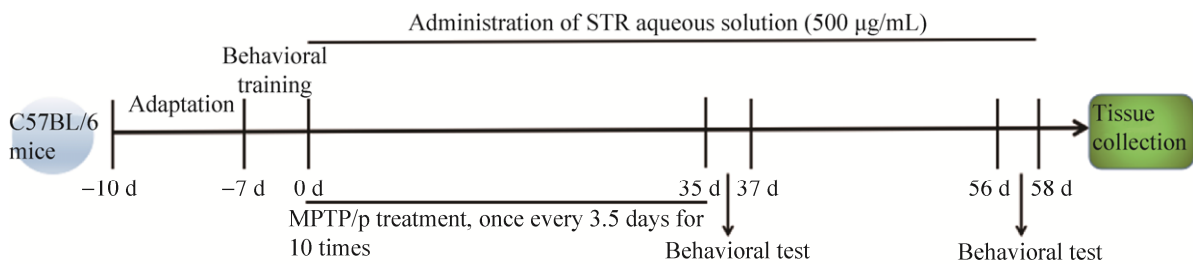


图 1. 动物模型构建

Figure 1. Animal model construction. CK: control group; STR: STR treated group; PD: MPTP/p induced Parkinson's disease model mice; PD_STR: STR treated PD model mice; $n=10$.

1.4 样品的收集

粪便样品: 于实验第 56 天把每只小鼠单独放于干净的无菌鼠笼内, 让其自由活动, 排出粪便后, 立即收集到无菌的 2.0 mL EP 管中, -80°C 保存。

血液、脑组织和结肠上皮细胞: 处理小鼠前一天晚上(第 58 天)禁食不禁水 12 h, 每组随机取 6 只小鼠于异氟烷深度麻醉前 20 min 灌胃 2.5% 的伊文思蓝溶液(溶解于 1.5% 的羧甲基纤维素钠) 0.3 mL, 深度麻醉后迅速打开胸腔, 快速心脏灌注生理盐水, 待右心耳流出的液体清亮为止; 每组其余 4 只小鼠均心脏取血, 用于检测血清内毒素(lipopolysaccharide, LPS)。所有小鼠后续操作均为: 快速剥离出完整的小鼠脑组织及结肠组织, 脑组织于 4% 的多聚甲醛溶液中固定, 结肠组织测量长度后提取肠上皮细胞于 -80°C 备用^[17]; 最后剥离出胃幽门至盲肠上端的小肠组织。

1.5 免疫组织检测小鼠脑组织酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)的表达

1.5.1 制备石蜡切片: 取出固定好的脑组织进行常规处理后包埋于石蜡中, 连续冠状切片(厚 4 μm), 保存 4°C 备用。每个组织每个部位各选取 5 张切片进行 TH 免疫组织化学染色。

1.5.2 免疫组织化学染色: 脑切片置于 0.01 mol/L 枸橼酸钠溶液(pH=6.0)微波修复抗原, PBS 漂洗 3 min \times 3 次; 3% 过氧化氢室温孵育 10 min 阻断内源性过氧化物酶, PBS 漂洗 3 min \times 3 次; 正常山羊血清室温封闭 30 min, 甩去多余的血清, 滴加 TH 一抗(1:800) 4°C 过夜; PBS 漂洗 3 min \times 3 次, 滴加生物素标记的二抗, 37°C 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 min \times 3 次。滴加辣根酶标记链霉卵白素工

作液, 37°C 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 min \times 3 次; DAB 显色, 封片, 拍照。

1.6 结肠长度与小肠传导率的测定

将肠组织移至干净的白纸上, 调整为一条直线, 切勿拉伸, 避免不必要的误差, 测量结肠长度; 同法测量胃幽门至伊文思蓝远端的距离和小肠全长, 两者的比值为伊文思蓝的小肠推进百分率, 即小肠传导率^[18]。

1.7 结肠上皮细胞炎性细胞因子丰度的 RT-PCR 检测

利用 TRNzol-A⁺试剂提取结肠上皮细胞的总 mRNA, 反转录为 cDNA。使用 Step One Plus System (ABI) 进行 GAPDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的实时定量 PCR (qPCR), 按照如下条件上机: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 30 s, 40 个循环。最后使用 $\Delta\Delta\text{C}_t$ 方法计算表达水平的倍数变化^[19]。

1.8 内毒素的检测

取小鼠血清样品 0.1 mL 直接加入反应主剂(C 因子、B 因子、凝固酶原及凝固蛋白原)中, 溶解后使用微量加样器转移至 10 mm \times 75 mm 标注玻璃反应管中(勿产生气泡), 插入到 MB 80 真菌/细菌动态检测系统中进行反应, 反应结束后系统自动计算出血清中 LPS 的含量^[20]。

1.9 肠道菌群结构分析

从实验第 8 周(第 56 天)收集的粪便样品中每组随机挑取 6 个, 共计 24 个进行 16S rRNA 基因的高通量测序, 采用细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区引物[338F(forward primer): ACTCCTACGGGAGGCAGCAG; 806R(reverse primer): GGACTACHVGGGTWTCTAAT]对粪便 DNA 进行 PCR 扩增。

对 PCR 产物进行回收、纯化和定量。根据 Illumina MiSeq 平台(Illumina, San Diego, USA)标准操作规程将纯化后的 PCR 产物构建 PE2*300 的文库。利用该平台进行测序,原始数据使用 Trimmomatic 软件质控,FLASH 软件进行拼接;使用 UPARES 软件(version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>),根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类;使用 UCHIME 软件剔除嵌合体。利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>)对每条序列进行物种分类注释,比对 Silva 数据库(<http://www.arbsilva.de/>),置信水平设置为 70%,从而对每个 OTU 进行物种分类,得到不同分类水平(门、纲、目、科和属)上的细菌分类信息。然后根据每个 OTU 中序列数目,得到每个样本 OTU 丰度表进行后续分析(上海美吉生物医药科技有限公司)。原始数据已上传至美国国立生物技术信息中心(NCBI)SRA(The Sequence Read Archive)数据库,登录号为 SPR159120。

1.10 统计学方法

使用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,通过单因素 ANOVA 进行统计学分析。数据表示为 mean±SD, $P < 0.05$ 表示差别有统计学意义。采用 Graphad Prism 5.01 软件作图。

2 结果和分析

2.1 硫酸链霉素和 MPTP/p 对小鼠体重的影响

实验过程中每周末对小鼠进行称重,小鼠体重变化随时间呈逐渐增长趋势,且组间差异均不显著,说明造模药物和硫酸链霉素的使用对小鼠体重无影响。结果见图 2。

2.2 硫酸链霉素对 PD 小鼠相关症状的改善

2.2.1 硫酸链霉素可改善 PD 小鼠运动功能障碍:

转棒实验结果如表 2 所示,实验第 5 周末 PD 组小鼠累积运动活性得分较 CK 组低 ($P < 0.05$), PD_STR 组较 PD 组无明显改善;实验第 8 周末 PD 组小鼠累积运动活性得分仍较 CK 组低 ($P < 0.01$),但 PD_STR 组较 PD 组显著升高 ($P < 0.05$)。爬杆测试结果显示在实验第 5 周末和第

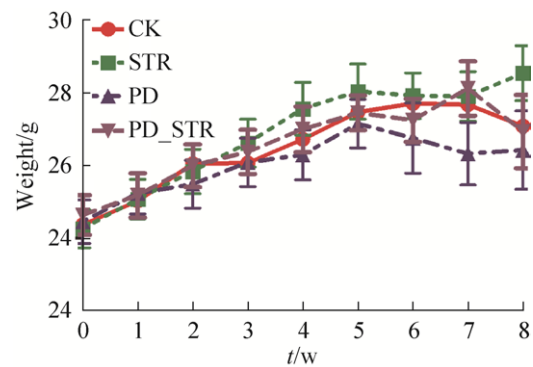


图 2. 不同组小鼠体重随时间的变化趋势

Figure 2. The trend of body weight change in different groups of mice over time. CK: control group; STR: STR treated group; PD: MPTP/p induced Parkinson's disease model mice; PD_STR: STR treated PD model mice; $n=10$.

表 2. 各组小鼠转棒测试 AUC 和爬杆总时间 ($\bar{x} \pm SD$, $n=10$)

Table 2. The AUC of rotating rod test and the total time of pole test ($\bar{x} \pm SD$, $n=10$)

Groups	AUC		T-total/s	
	5 th week	8 th week	5 th week	8 th week
CK	1607.40±190.81a	1503.94±182.08a	6.4±0.82c	6.55±0.79c
STR	1486.20±175.37a	1408.20±221.49ab	6.95±1.09c	6.96±0.73bc
PD	1025.00±101.71b	909.18±85.14c	9.65±1.11a	10.30±1.31a
PD_STR	1099.20±124.09b	1171.18±125.32b	8.07±0.78b	8.27±0.55b

Significant differences ($P < 0.05$) between treatments are indicated by the letters a, b, or c. CK: control group; STR: STR treated group; PD: MPTP/p induced Parkinson's disease model mice; PD_STR: STR treated PD model mice; $n=10$.

8 周末, PD 组小鼠完成爬杆实验所需时间较 CK 组长($P<0.01$), 而 PD_STR 组较 PD 组所需时间显著缩短($P<0.05$)。因此硫酸链霉素可改善 PD 小鼠的运动功能障碍。

2.2.2 硫酸链霉素可减少 PD 小鼠黑质纹状体中多巴胺能神经元及其纤维的丢失: TH 是合成 DA 过程中的限速酶, TH⁺细胞可代表 DA 能神经元。PD 组小鼠黑质部位 DA 神经元的数量和纹状体 DA 能神经元纤维的光密度较 CK 组极显著减少($P<0.01$), 而硫酸链霉素的使用均可改善 PD 小鼠

黑质纹状体系统中 DA 能神经元和神经纤维的减少($P<0.05$)(图 3)。

2.2.3 硫酸链霉素对 PD 小鼠胃肠道功能的影响: 测量小鼠结肠长度和小肠转运速率评估各组小鼠的胃肠道功能。结果如图 4-A 所示, PD 组和 PD_STR 组小鼠结肠长度较 CK 组显著变短($P<0.05$)。PD 组小鼠小肠传导速率与 CK 组相比极显著变慢($P<0.01$), 但 PD_STR 组小鼠与 CK 组差异不显著(图 4-B), 因此硫酸链霉素可在一定程度上改善 PD 小鼠的胃肠道功能。

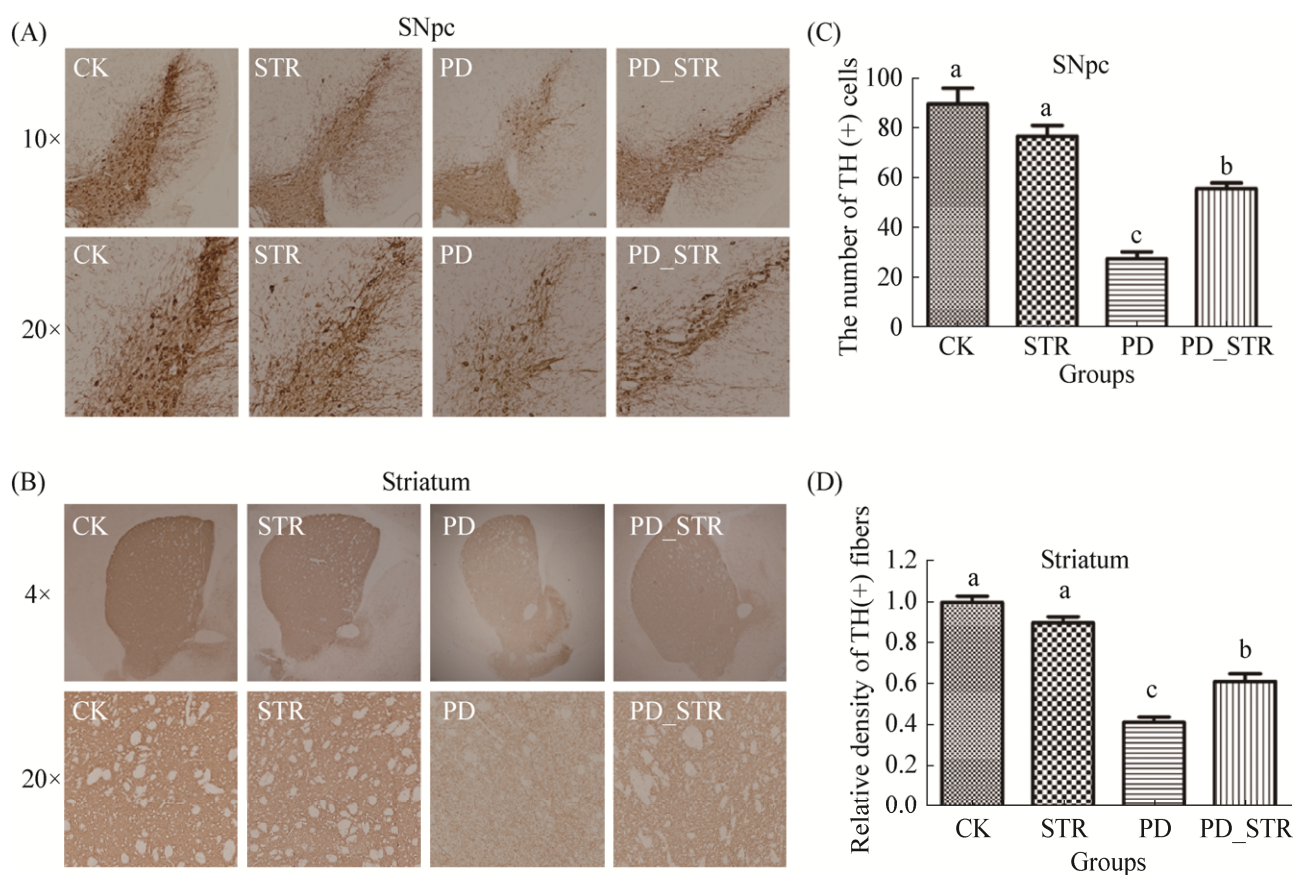


图 3. 黑质纹状体系统中 TH 的免疫组织化学染色

Figure 3. Immunohistochemical staining of TH in the nigrostriatal system. A: representative IHC staining for TH neurons in the SNpc; B: representative IHC staining for TH fibers in the striatum; C: quantitative analysis of the number of TH-positive cells in the SNpc; D: quantitative analysis of the optical density of TH-positive fibers in the Striatum. Significant differences ($P<0.05$) between treatments are indicated by the letters a, b, or c. CK: control group; STR: STR treated group; PD: MPTP/p induced Parkinson's disease model mice; PD_STR: STR treated PD model mice; $n=10$.

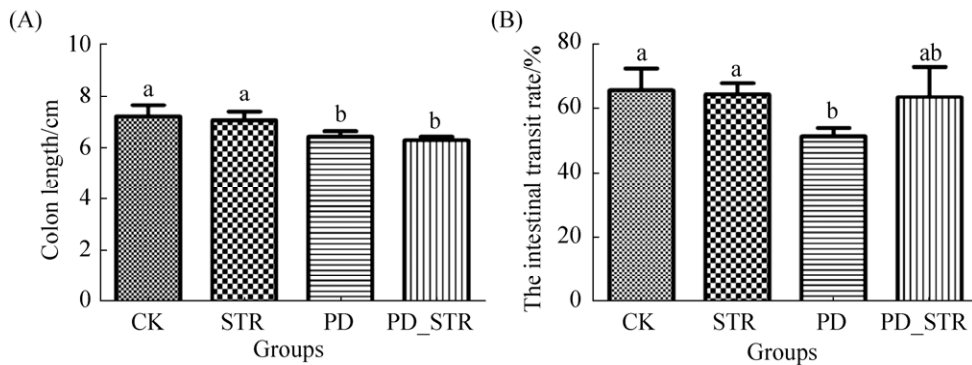


图 4. 各组小鼠结肠长度和小鼠小肠传导率

Figure 4. Colon length and intestinal transit rate in each group of mice. A: the colon length of each group mice; B: the intestinal transit rate of each group mice. Significant differences ($P < 0.05$) between treatments are indicated by the letters a, b, or c. CK: control group; STR: STR treated group; PD: MPTP/p induced Parkinson's disease model mice; PD_STR: STR treated PD model mice; $n=10$.

2.2.4 硫酸链霉素可改善 PD 小鼠的肠道炎症:

PD 组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 表达增高(PD vs. CK, $P < 0.01$), STR 作用于慢性 PD 小鼠可显著降低炎症细胞因子 mRNA 表达水平(PD_STR vs. PD, $P < 0.05$)(图 5)。

2.2.5 硫酸链霉素可降低 PD 小鼠血清内毒素的含量: PD 组小鼠血清 LPS 含量极显著高于其他各组小鼠($P < 0.001$), 而 PD_STR 组与 CK 组差异不

显著(图 6), 说明硫酸链霉素可显著降低 PD 组小鼠血清内毒素的含量。

2.3 硫酸链霉素对 PD 小鼠肠道菌群的影响

2.3.1 Alpha (α)多样性分析: 按照最小样本序列进行抽平分析, 每个样品均取 25419 条序列, 每个序列平均长度为 437 bp, 97%相似度水平的 OTU 有 568 个。基于 OTU 水平的 α 多样性分析结果如表 3 所示: Coverage 指数在各样本中最低

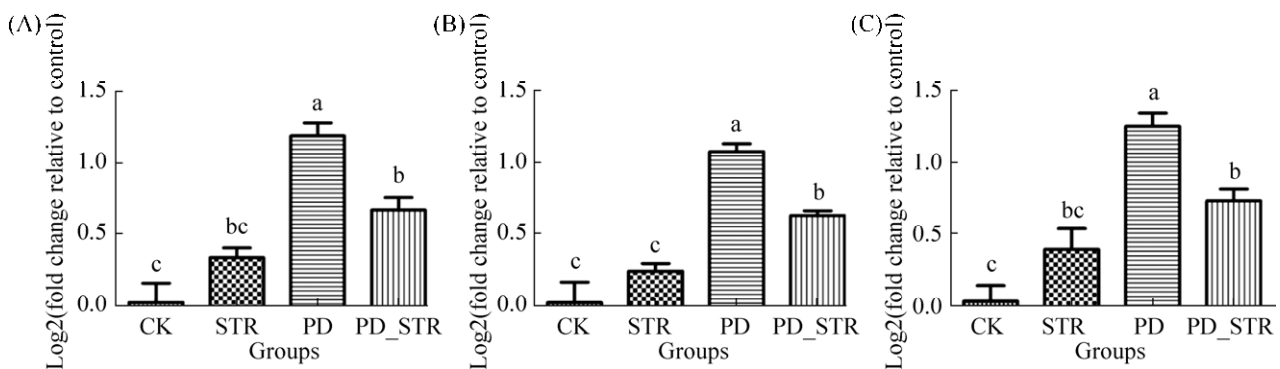


图 5. 结肠上皮细胞炎症性细胞因子 mRNA 相对丰度检测结果

Figure 5. The relative abundance of inflammatory cytokines mRNA in the colonic epithelial cells. A: TNF- α ; B: IL-6; C: IL-1 β . Significant differences ($P < 0.05$) between treatments are indicated by the letters a, b, or c. CK: control group; STR: STR treated group; PD: MPTP/p induced Parkinson's disease model mice; PD_STR: STR treated PD model mice; $n=4$.

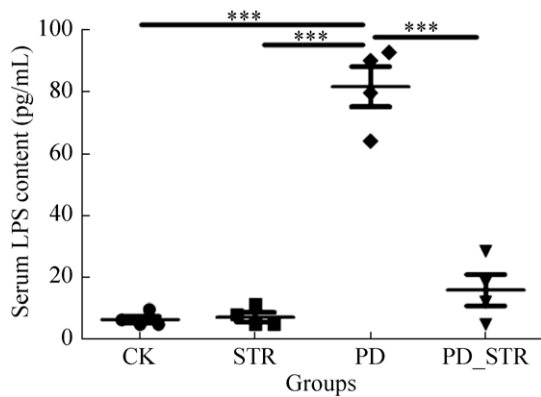


图 6. 血清内毒素检测结果

Figure 6. Serum LPS content. ***: $P < 0.001$. CK: control group; STR: STR treated group; PD: MPTP/p induced Parkinson's disease model mice; PD_STR: STR treated PD model mice; $n=4$.

表 3. 高通量测序微生物多样性分析

Table 3. High-throughput sequencing microbial diversity analysis

Groups	Coverage	Shannon	Chao
CK	0.9975±0.0002a	4.1199±0.1988b	437.7808±46.5193a
STR	0.9988±0.0001a	3.4893±0.2654c	245.0009±29.4946b
PD	0.9979±0.0003a	4.5182±0.1697a	444.2088±22.4568a
PD_STR	0.9988±0.0004a	3.6478±0.1563c	255.6389±31.8720b

Significant differences ($P < 0.05$) between treatments are indicated by the letters a, b, or c. CK: control group; STR: STR treated group; PD: MPTP/p induced Parkinson's disease model mice; PD_STR: STR treated PD model mice; $n=6$.

为 99.75%，表明本次测序结果可代表样品中微生物的真实情况；Shannon 指数表明，PD 组小鼠肠道菌群较 CK 组更具多样性；Shannon 和 Chao 指数表明 STR 的应用降低了小鼠肠道菌群的多样性。

2.3.2 Beta (β)多样性分析：基于 bray_curtis 的 3D-PCA 分析显示 PC1、PC2 和 PC3 的贡献值分别为 46.61%、13.44%、9.59%，表明各组样品重复性较好(图 7-A)；基于 OTU 水平的相似性分析 (analysis of similarities, ANOSIM)结果 R 值为 0.6837, $P=0.001$ ，表明组间细菌群落结构具有显著性差异(图 7-B)。

2.3.3 物种组成分析：进一步分析各组小鼠肠道菌群组成,发现与 CK 组相比,PD 组 *Bacteroidetes* 丰度显著降低($P < 0.05$),而 STR 处理后,PD_STR 组 *Bacteroidetes* 丰度上升;CK、STR、PD 与 PD_STR 组 F/B 比值分别为 0.8857 ± 0.1037 、 0.6911 ± 0.1391 、 1.3037 ± 0.0815 与 0.8241 ± 0.2029 ，表明 PD 组在门水平上就出现了肠道菌群紊乱，硫酸链霉素可以改善 PD 小鼠的菌群紊乱(图 8-A 和 8-B)。在科的水平上，与 CK 组相比，PD 组

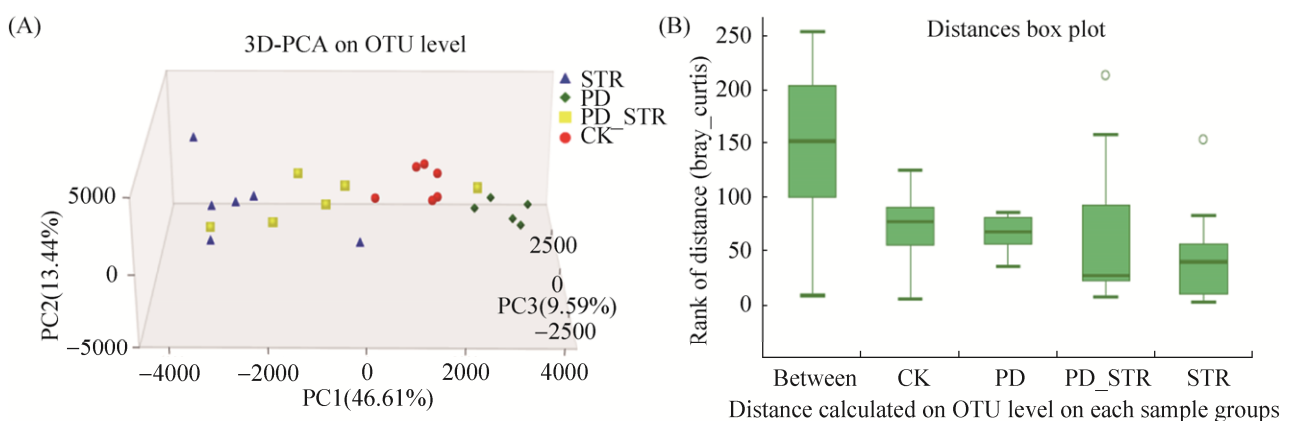


图 7. 基于 OTU 水平的 β 多样性分析

Figure 7. Beta diversity analysis based on OTU level. A: 3D-PCA analysis; B: ANOSIM analysis ($R=0.6837$, $P=0.001$). CK: control group; STR: STR treated group; PD: MPTP/p induced Parkinson's disease model mice; PD_STR: STR treated PD model mice; $n=6$.

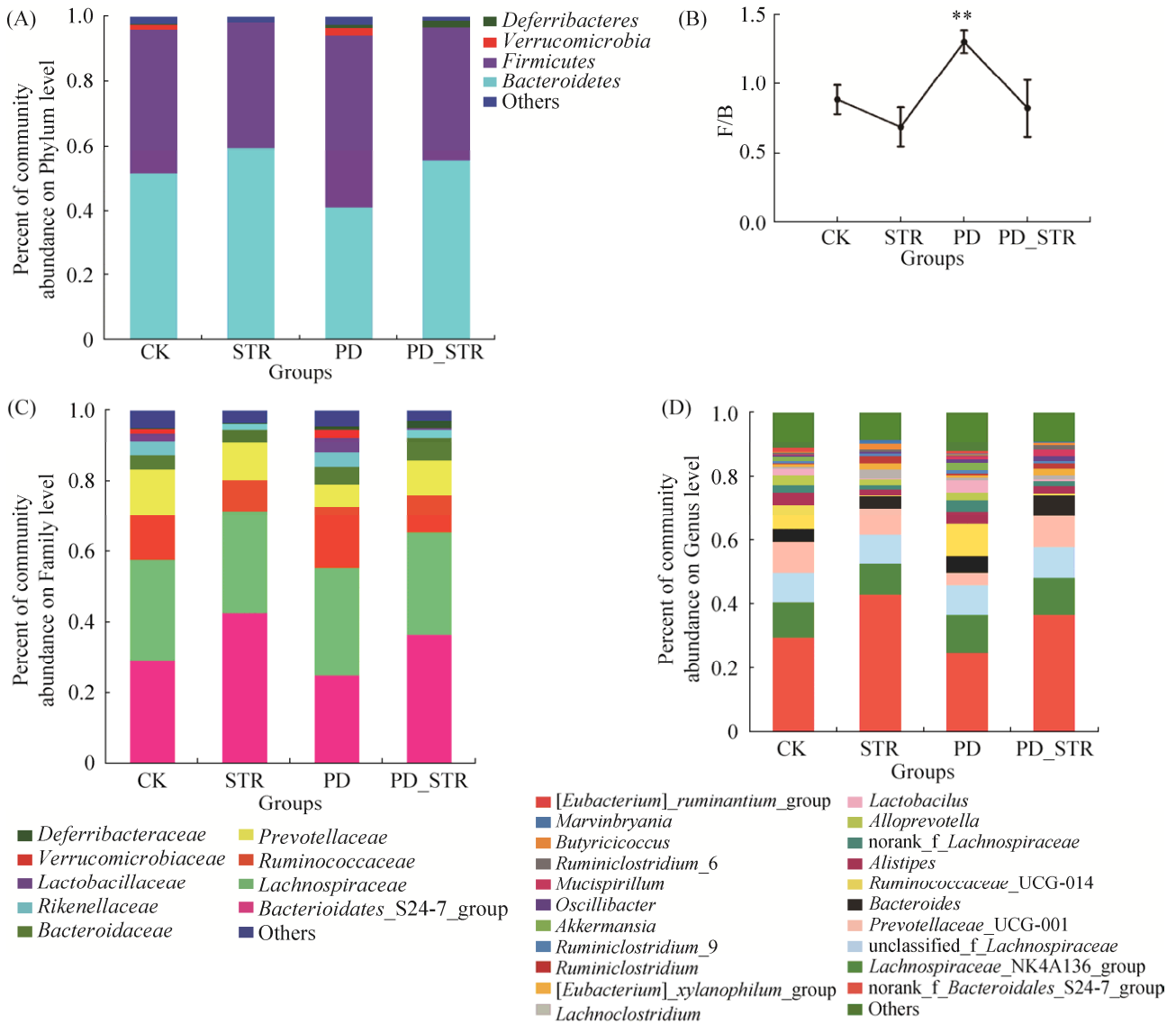


图 8. 不同分类学水平的细菌群落组成分析

Figure 8. Analysis of bacterial flora composition at different taxonomic levels. A: relative abundance of phyla >1% in different groups; B: the ratio of Firmicutes/Bacteroidetes; C: relative abundance of family >1% in different groups; D: relative abundance of genus >1% in different groups. The abscissa is the group name, the ordinate is the proportion of the species in the group of samples, the columns of different colors represent different species, and the length of the column represents the proportion of the species (A and C). CK: control group; STR: STR treated group; PD: MPTP/p induced Parkinson’s disease model mice; PD_STR: STR treated PD model mice; n=6.

Ruminococcaceae 丰度(17.35%±1.40% vs. 12.53%±1.29%, $P<0.01$)极显著升高, *Deferribacteraceae* (1.00%±0.26% vs. 0.27%±0.09%, $P<0.05$)丰度显著升高, *Prevotellaceae* (6.28%±0.56% vs. 12.89%±

1.72%, $P<0.01$)丰度极显著降低; 硫酸链霉素处理可逆转 PD 小鼠肠道中这些菌群丰度的改变, *Ruminococcaceae* 和 *Prevotellaceae* 的丰度在 PD_STR 组中与 CK 相比均无显著性差异(图 8-C)。

在属的分类水平上, 相对丰度超过 1% 的菌属有 21 个。与 CK 组相比, PD 组小鼠肠道菌群中 *Prevotellaceae*_UCG-001 (3.97%±0.39% vs. 9.61%±1.30%, $P<0.01$) 丰度极显著降低, *Oscillibacter* (1.13%±0.21% vs. 0.51%±0.07%, $P<0.01$) 丰度极显著升高; 硫酸链霉素处理后(PD_STR), 与 PD 组相比 *Prevotellaceae*_UCG-001 (9.82%±1.74% vs. 3.97%±0.39%, $P<0.05$) 丰度显著升高, *Ruminococcaceae*_UCG-014 (0.55%±0.26% vs. 10.11%±1.39%, $P<0.01$) 丰度极显著降低、*norank_f_Lachnospiraceae* (1.50%±0.24% vs. 3.56%±0.60%, $P<0.05$) 丰度显著降低(图 8-D)。

2.3.4 物种差异分析: LEfSe 分析采用线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)估计每个物种丰度对差异效果影响的大小。利用该分析(LDA=3.0)筛选出各组特征性菌科, 结果如图 9-A 所示, CK 组的特征菌科为 *Eubacteriaceae*、*Erysipelotrichaceae*、*Rhodospirillaceae*; PD 组的特征菌科为 *Ruminococcaceae*、*Lactobacillaceae*、*Enterobacteriaceae*、*Rikenellaceae*、*Verrucomicrobiaceae* 等; PD_STR 组的特征菌科为 *Christensenellaceae*; STR 组的特征菌科为 *Aerococcaceae*、*Aerococcaceae*。属水平的 LEfSe 分析(LDA=3.5)显示 CK 组的特征菌属为 *Alloprevotella*、*Eubacterium_ruminantium_group*、*Lachnospiraceae*_UCG_008、*Ruminococcus_2*; PD 组的特征菌属为 *Ruminococcaceae*_UCG_014、*Lactobacillus*、*Alistipes*、*Akkermansia*、*Lachnospiraceae*_UCG_001; PD_STR 组的特征菌属为 *Prevotellaceae*_UCG_001、*Oscillibacter*、*Ruminiclostridium_6*、*Ruminiclostridium_5*; STR 组的特征菌属为 *norank_f_Bacteroidales_S24_7_*

group、*Lachnoclostridium*、*Ruminiclostridium*、*Butyricoccus*、*Marvinbryantia* (图 9-B)。

3 讨论

帕金森症的发病率呈逐年递增的趋势, 目前临床上只能缓解症状, 达不到治愈的目的。揭示 PD 的发病机制, 寻找治愈 PD 的方法一直是医学研究的方向。随着肠道微生态研究的深入, 发现肠道微生物群紊乱不仅影响运动症状, 还影响 PD 动物的脑功能^[12,21]。慢性 MPTP/p 小鼠模型常用于研究 DA 能神经元变性的机制^[15]。在本实验中, 构建了 MPTP/p 慢性小鼠模型, 通过使用硫酸链霉素干预肠道菌群评估肠道细菌在慢性 PD 发生发展中的作用。实验结果显示慢性 PD 小鼠与正常小鼠相比无论是爬杆还是转棒测试都表现出较低的运动活性; 且在脑组织免疫组化结果显示黑质 DA 能神经元丢失过多, 纹状体 DA 能神经元纤维明显减少。这符合之前的研究结果^[22-23], 然而硫酸链霉素应用改善了慢性 PD 小鼠的运动损伤, 同时也缓解了脑组织黑质部 DA 能神经元的丧失和纹状体中 DA 能神经元纤维的减少, 说明硫酸链霉素对慢性 PD 小鼠具有一定的保护作用。

除了目前已经明确的运动障碍外, PD 常出现各种非运动症状(non-motor symptoms, NMS)特征, 如胃肠道功能障碍、认知障碍、睡眠障碍等。研究表明 98.6% 的 PD 患者至少存在一种 NMS^[24], 胃肠道功能障碍最常见, 50%–90% 的 PD 患者有便秘症状^[25-27]。PD 的便秘在很大程度上是由于食物或代谢物在肠道转运时间延长, 据报道 PD 患者较正常对照小肠转运时间延长^[28]。本研究中, 慢

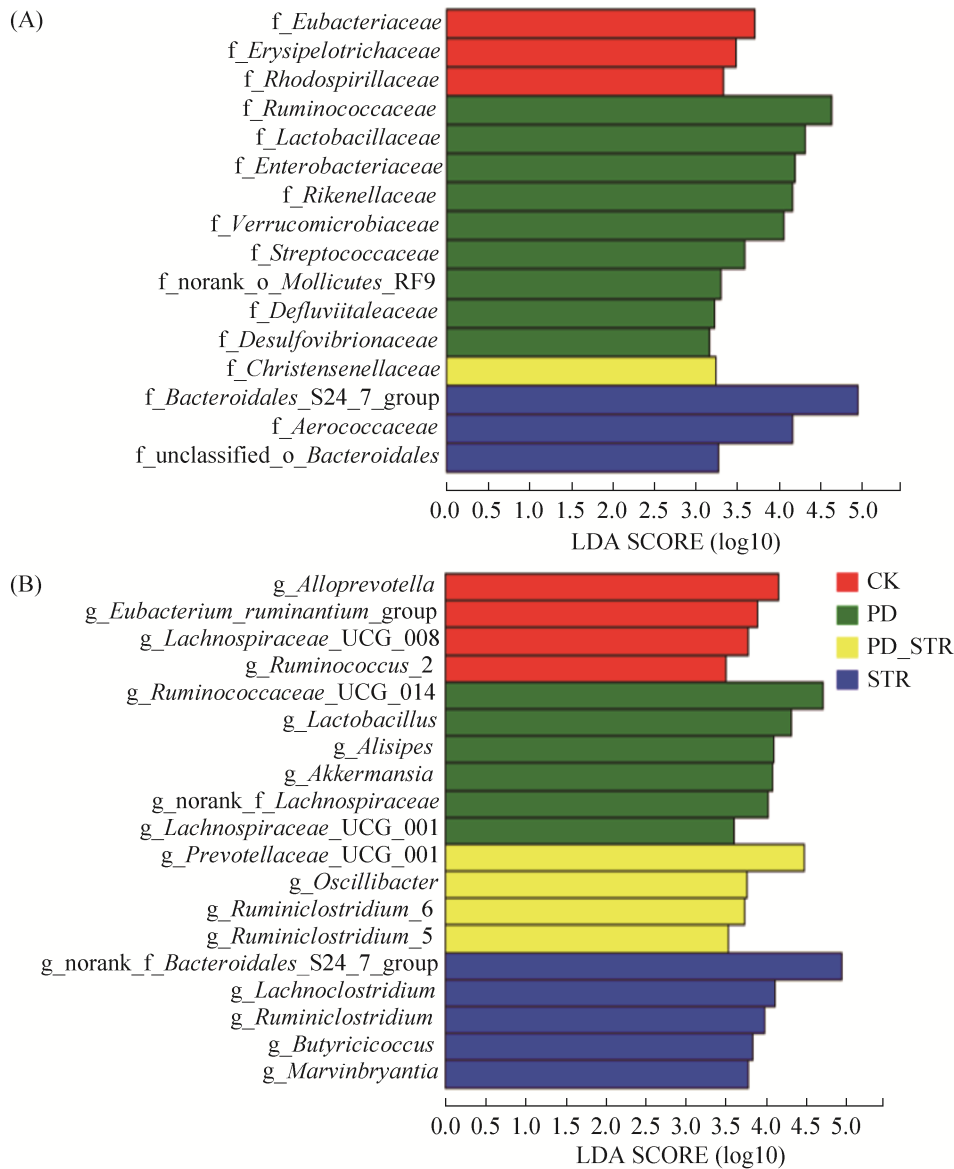


图 9. 科和属水平的差异物种分析

Figure 9. The analysis of differential species at the level of family and genus. The LDA score obtained by LDA analysis (linear regression analysis), the larger the LDA score, the greater the influence of bacteria abundance on the difference effect. CK: control group; STR: STR treated group; PD: MPTP/p induced Parkinson's disease model mice; PD_STR: STR treated PD model mice; $n=6$.

性 PD 小鼠表征小肠转运时间的小肠传导率显著低于正常小鼠；有趣的是，PD_STR 组小鼠小肠传导率与正常小鼠和 PD 小鼠均无显著性差异，表明应用硫酸链霉素后慢性 PD 小鼠的肠道功能障碍得到了一定的改善。

最近的一项研究指出肠道炎症是 PD 发病机制的沉默驱动因素，慢性促炎免疫活性越来越多被认为是神经退行性疾病的基本要素，并且 PD 患者肠道中的炎症似乎与 PD 发病机理特别相关^[29]。PD 患者肠道存在低度炎性反应已得到证实，其特

征为促炎细胞因子表达增高, 肠神经中神经胶质细胞失调^[30]。在本研究中, 我们通过小鼠结肠上皮促炎细胞因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β) mRNA 丰度检测验证了小鼠结肠炎症的存在。硫酸链霉素药动学特性为口服吸收较差, 但在本研究中其应用在一定程度上抑制了炎症的进展, 这可能与干扰肠道菌群密切相关^[31]。

鉴于 PD 患者出现的肠道微生态失调^[32-33], 我们对小鼠的粪便样品进行了细菌 16S rRNA 的高通量测序分析, 结果亦表明: 与正常对照小鼠相比, 慢性 PD 小鼠肠道细菌群落结构发生了显著改变。Sun 等的研究表明 PD 小鼠与正常小鼠相比肠道菌群中 *Firmicutes* 丰度显著降低, *Proteobacteria* 丰度显著升高^[21]; 而 Unger 等的研究证实 PD 患者与健康对照者相比粪便微生物中 *Bacteroidetes* 丰度显著下降^[34]。本研究结果表明慢性 PD 小鼠肠道细菌 *Firmicutes/Bacteroidetes* 比值较正常小鼠显著升高, 而硫酸链霉素的干预可逆转 F/B 比值使其接近正常小鼠, 说明硫酸链霉素具有调节 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 丰度来重新平衡肠道菌群的能力。

Prevotellaceae 可参与肠道黏膜层中黏蛋白的合成, 并通过可溶性纤维的发酵产生具有营养神经细胞和抗炎作用的短链脂肪酸^[35], 而 *Prevotellaceae* 的减少可导致肠黏液减少和肠道通透性增加, 增加局部和全身对细菌抗原和 LPS 的易感性, 从而诱导大量的 α -突触核蛋白的过表达和错误折叠^[35-36]。本研究中 PD 小鼠与健康小鼠相比, *Prevotellaceae* 丰度显著降低, 硫酸链霉素应用后 *Prevotellaceae* 丰度则显著增加, 且 PD 相关症状明显改善, *Prevotellaceae* 可能是 PD 发生发展的关键功能菌群。

最近研究表明在 PD 患者的肠道中 *Alistipes*、

Lactobacillus 和 *Akkermansia* 丰度较正常对照者显著升高^[5,32,37-38]。而本实验中属水平的 LEfSe 分析结果亦显示 *Lactobacillus*、*Alistipes*、*Akkermansia* 是 PD 组小鼠肠道中的特征性菌群, 同时也发现 PD 小鼠肠道中参与黏蛋白降解的 *Akkermansia* 菌丰度较其他三组小鼠有增加趋势, 这些菌是否参与了 PD 的发生发展以及硫酸链霉素是否通过这些菌对肠道功能进行了调节亦有待深入探究。

由肠道微生物的变化引起的炎症将导致血脑屏障完整性的变化, 血液中的 LPS 更易进入脑内^[39], 而 LPS 已被证明可引起黑质多巴胺能神经元的炎症^[40]。Elena 等将 LPS 注射到两种最常见的 LRRK2 基因突变的小鼠体内时, 导致了小鼠强烈的免疫反应, 炎症细胞因子丰度升高, 且这些升高的细胞因子通过血脑屏障进入大脑, 导致小胶质细胞活化并破坏运动所涉及的大脑区域, 表明革兰阴性菌感染对于帕金森的发病可能有重要促进作用^[41]。本研究结果显示慢性 PD 小鼠血清 LPS 含量明显高于正常小鼠水平, 硫酸链霉素干预后血清 LPS 含量显著降低; 硫酸链霉素的使用可能抑制了部分革兰阴性菌的生长, 从根源上减少了 LPS 的产生, 从而对 PD 的发生发展具有抑制作用。

综上所述, 慢性 PD 小鼠存在肠道菌群失调, 口服硫酸链霉素可改善慢性 PD 小鼠的肠道炎症反应, 延缓脑内 DA 能神经元及其纤维的损伤, 进而改善慢性小鼠的运动功能障碍, 这可能与其对肠道菌群的调节作用有关。后续工作将聚焦于与 PD 相关的功能菌群, 深入揭示硫酸链霉素改善 PD 症状的具体机制。

参 考 文 献

- [1] Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 2014, 29(13): 1583-1590.

- [2] Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T, Pringsheim T. The incidence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*, 2016, 46(4): 292–300.
- [3] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 2003, 39(6): 889–909.
- [4] Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*, 2015, 30(3): 350–358.
- [5] Qian YW, Yang XD, Xu SQ, Wu CY, Song YY, Qin N, Chen SD, Xiao Q. Alteration of the fecal microbiota in Chinese patients with Parkinson's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2018, 70: 194–202.
- [6] Daubner SC, Le T, Wang SZ. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, 508(1): 1–12.
- [7] Lotan D, Cunningham M, Joel D. Antibiotic treatment attenuates behavioral and neurochemical changes induced by exposure of rats to group A streptococcal antigen. *PLoS One*, 2014, 9(6): e101257.
- [8] Du YS, Ma ZZ, Lin SZ, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson DL, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP, Paul SM. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(25): 14669–14674.
- [9] Radad K, Moldzio R, Rausch WD. Minocycline protects dopaminergic neurons against long-term rotenone toxicity. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 2010, 37(1): 81–85.
- [10] Inamdar AA, Chaudhuri A, O'Donnell J. The protective effect of minocycline in a paraquat-induced Parkinson's disease model in drosophila is modified in altered genetic backgrounds. *Parkinson's Disease*, 2012, 2012: 938528.
- [11] Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Carvajal JM, Zadeh M, Gong MH, Qi YF, Zubcevic J, Sahay B, Pepine CJ, Raizada MK, Mohamadzadeh M. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*, 2015, 65(6): 1331–1340.
- [12] Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schretter CE, Rocha S, Gradinaru V, Chesselet MF, Keshavarzian A, Shannon KM, Krajmalnik-Brown R, Wittung-Stafshede P, Knight R, Mazmanian SK. Gut Microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell*, 2016, 167(6): 1469–1480.
- [13] Sekirov I, Tam NM, Jogova M, Robertson ML, Li YL, Lupp C, Finlay BB. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infection and Immunity*, 2008, 76(10): 4726–4736.
- [14] Meredith GE, Totterdell S, Potashkin JA, Surmeier DJ. Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2008, 14(S2): S112–S115.
- [15] Petroske E, Meredith GE, Callen S, Totterdell S, Lau YS. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience*, 2001, 106(3): 589–601.
- [16] Heng Y, Zhang QS, Mu Z, Hu JF, Yuan YH, Chen NH. Ginsenoside Rg1 attenuates motor impairment and neuroinflammation in the MPTP-probenecid-induced parkinsonism mouse model by targeting α -synuclein abnormalities in the substantia nigra. *Toxicology Letters*, 2016, 243: 7–21.
- [17] Tong C, Yin ZN, Song ZB, Dockendorff A, Huang CS, Mariadason J, Flavell RA, Davis RJ, Augenlicht LH, Yang WC. c-Jun NH₂-terminal kinase 1 plays a critical role in intestinal homeostasis and tumor suppression. *The American Journal of Pathology*, 2007, 171(1): 297–303.
- [18] Zhang Y, Wang YL, Wu WY, Li QJ, Lin J, Zhu T, Luo H. Experimental study of zhizhu dangshen granules on intestinal propulsive function and antemetic effect. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2015, 50(9): 1286–1289. (in Chinese)
张燕, 王宇翎, 吴文字, 李前进, 林杰, 朱韬, 罗欢. 枳术党参颗粒肠推进和镇吐作用的实验研究. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(9): 1286–1289.
- [19] Bhatt RS, Kothari ST, Gohil DJ, D'Souza M, Chowdhary AS. Novel evidence of microglial immune response in impairment of Dengue infection of CNS. *Immunobiology*, 2015, 220(10): 1170–1176.
- [20] Chen S, Wu HQ, Chen S, Yang YG. The value of quantitative determination of urine endotoxin for rapid diagnosis of urinary tract infections caused by Gram-negative bacteria. *Chinese Journal of Microecology*, 2015, 27(6): 732–734. (in Chinese)
陈轼, 王昊泉, 陈松, 杨永刚. 尿内毒素定量检测对快速诊断革兰阴性菌导致的泌尿道感染的价值研究. *中国微生物生态学杂志*, 2015, 27(6): 732–734.
- [21] Sun MF, Zhu YL, Zhou ZL, Jia XB, Xu YD, Yang Q, Cui C, Shen YQ. Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: Gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF- α signaling pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2018, 70: 48–60.
- [22] Shi XJ, Chen YH, Liu H, Qu HD. Therapeutic effects of paeonol on methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine/probenecid-induced Parkinson's disease in mice. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 14(3): 2397–2404.

- [23] Zhang QS, Heng Y, Chen Y, Luo P, Wen L, Zhang Z, Yuan YH, Chen NH. A novel bibenzyl compound (20C) protects mice from 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine/probenecid toxicity by regulating the α -Synuclein-related inflammatory response. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2017, 363(2): 284–292.
- [24] Barone P, Antonini A, Colosimo C, Marconi R, Morgante L, Avarello TP, Bottacchi E, Cannas A, Ceravolo G, Ceravolo R, Cicarelli G, Gaglio RM, Giglia RM, Iemolo F, Manfredi M, Meco G, Nicoletti A, Pederzoli M, Petrone A, Pisani A, Pontieri FE, Quatralo R, Ramat S, Scala R, Volpe G, Zappulla S, Bentivoglio AR, Stocchi F, Trianni G, del Dotto P, PRIAMO study group. The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 2009, 24(11): 1641–1649.
- [25] Cersosimo MG, Raina GB, Pecci C, Pellene A, Calandra CR, Gutiérrez C, Micheli FE, Benarroch EE. Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. *Journal of Neurology*, 2013, 260(5): 1332–1338.
- [26] Ueki A, Otsuka M. Life style risks of Parkinson's disease: association between decreased water intake and constipation. *Journal of Neurology*, 2004, 251(S7): vii18–vii23.
- [27] Mukherjee A, Biswas A, Das SK. Gut dysfunction in Parkinson's disease. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(25): 5742–5752.
- [28] Dutkiewicz J, Szlufik S, Nieciecki M, Charzyńska I, Królicki L, Smektała P, Friedman A. Small intestine dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 2015, 122(12): 1659–1661.
- [29] Houser MC, Tansey MG. The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? *npi Parkinson's Disease*, 2017, 3: 3.
- [30] Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, Coron E, des Varannes SB, Naveilhan P, Nguyen JM, Neunlist M, Derkinderen P. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 2013, 50: 42–48.
- [31] Peng XL, Fan YX, Zhang L, Chen DJ, Zhang J. Research update on the therapeutic drug monitoring of aminoglycosides. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2017, 17(1): 104–109. (in Chinese)
彭小林, 范亚新, 张亮, 陈代杰, 张菁. 氨基糖苷类抗生素治疗药物浓度监测的研究进展. *中国感染与化疗杂志*, 2017, 17(1): 104–109.
- [32] Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, Wissemann WT, Lewis MR, Wallen ZD, Peddada SD, Factor SA, Molho E, Zabetian CP, Knight R, Payami H. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Movement Disorders*, 2017, 32(5): 739–749.
- [33] Li W, Wu XL, Hu X, Wang T, Liang S, Duan YF, Jin F, Qin B. Structural changes of gut microbiota in Parkinson's disease and its correlation with clinical features. *Science China Life Sciences*, 2017, 60(11): 1223–1233.
- [34] Unger MM, Spiegel J, Dillmann KU, Grundmann D, Philippeit H, Bürmann J, Faßbender K, Schwirtz A, Schäfer KH. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2016, 32: 66–72.
- [35] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin JJ, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, De Vos WM, Brunak S, Doré J, MetaHIT Consortium, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, 473(7346): 174–180.
- [36] Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, Voigt RM, Shaikh M, Jaglin JA, Estes JD, Dodiya HB, Keshavarzian A. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28032.
- [37] Hasegawa S, Goto S, Tsuji H, Okuno T, Asahara T, Nomoto K, Shibata A, Fujisawa Y, Minato T, Okamoto A, Ohno K, Hirayama M. Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson's disease. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142164.
- [38] Bedarf JR, Hildebrand F, Coelho LP, Sunagawa S, Bahram M, Goeser F, Bork P, Willner U. Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients. *Genome Medicine*, 2017, 9: 39.
- [39] Hu X, Wang T, Jin F. Alzheimer's disease and gut microbiota. *Science China Life Sciences*, 2016, 59(10): 1006–1023.
- [40] Liu B, Jiang JW, Wilson BC, Du L, Yang SN, Wang JY, Wu GC, Cao XD, Hong JS. Systemic infusion of naloxone reduces degeneration of rat substantia nigral dopaminergic neurons induced by intranigral injection of lipopolysaccharide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000, 295(1): 125–132.
- [41] Kozina E, Sadasivan S, Jiao Y, Dou YC, Ma ZJ, Tan HY, Kodali K, Shaw T, Peng JM, Smeyne RJ. Mutant LRRK2 mediates peripheral and central immune responses leading to neurodegeneration *in vivo*. *Brain*, 2018, 141(6): 1753–1769.

Effect of oral administration of streptomycin sulfate on symptoms and gut microbiota of Parkinson's disease mice

Yunying An¹, Minna Wu^{1*}, Puze Li¹, Xinrui Jing¹, Jianfeng Zhang¹, Hongfei Xue¹, Baoguo Deng¹, Genshen Zhong²

¹ School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

² School of Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Abstract: [Objective] To investigate the effect of streptomycin sulfate on the symptoms and gut microbiota of chronic Parkinson's disease mice. [Methods] Forty C57BL/6 mice were randomly divided into the control group, streptomycin sulfate control group, Parkinson's disease (PD) model group and streptomycin sulfate treated PD model group. PD mice were induced by injecting 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (25 mg/kg) combined with probenecid (250 mg/kg) at the first 5 weeks of the experiment; the streptomycin sulfate treated PD mice began to drink the streptomycin aqueous solution (500 µg/mL) on the first day of the experiment until the end of the experiment. A variety of experimental methods, such as rotarod test, pole test, immunohistochemistry, real-time PCR, and high-throughput sequencing were used to detect the related symptoms and indicators of each group. [Results] Compared with the control, chronic PD mice showed motor impairment ($P<0.01$), dopaminergic neurons in the nigrostriatum and their fibers in the striatum reduced significantly ($P<0.01$), intestinal dysfunction and inflammation, along with the structure of gut microbiota changed significantly: the ratio of *Firmicutes/Bacteroides* and the abundance of Family *Ruminococcaceae* increased ($P<0.01$), whereas the abundance of Family *Prevotellaceae* and Genus *Prevotellaceae_UCG-001* decreased ($P<0.01$). The intervention of streptomycin sulfate significantly improved the exercise capacity of chronic PD mice ($P<0.05$), relieved the decrease of dopaminergic neurons and fibers in the nigrostriatal system ($P<0.05$), and improved the intestinal dysfunction and inflammation, meanwhile reduced the ratio of the *Firmicutes/Bacteroides* and the abundance of Family *Ruminococcaceae*, *Rikenellaceae* and *Lactobacillaceae* and increased the abundance of Family *Prevotellaceae* and Genus *Prevotellaceae_UCG-001*. [Conclusion] Streptomycin sulfate can relieve the symptoms associated with PD mice and affect the gut microbiota of PD mice.

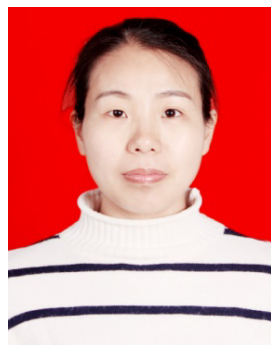
Keywords: gut microbiota, streptomycin sulfate, Parkinson's disease, inflammation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81872361), by the Xinxiang Medical University Psychiatry Neurology Subject Group Support Program (2016PN-KFKT-12) and by the Open Project of Henan Provincial Key Laboratory of Neuroremediation (HNSJXF-2016-012)

*Corresponding author. E-mail: minnawu@xxmu.edu.cn

Received: 6 September 2018; Revised: 29 December 2018; Published online: 13 February 2019



吴敏娜, 博士, 副教授, 硕士研究生导师。新乡医学院基础医学院微生物学教研室副主任, 兼任河南省微生物学会微生态专业委员会副主任委员。目前主要从事医学微生物学的教学及肠道微生态与疾病的科研工作, 利用基因敲除和化学药物诱导疾病模型小鼠, 通过高通量测序检测肠道菌群组成和 GC-MS 检测粪便代谢谱差异, 结合免疫组化、流式细胞术及分子病理等技术, 分析肠道微生物群落结构和特异功能菌群与相关疾病发生发展的关系。先后参加国家 973 计划、中科院百人计划相关课题, 并主持国家自然科学基金、河南省科技攻关、河南省高校重点科研项目等多项课题, 以第一作者或通信作者发表 SCI 论文 20 余篇。