



高通量测序分析实验性脑脊髓膜炎肠道微生物变化及与 IL-17、IFN- γ 相关性

李晓玲¹, 张博², 孙梦娇¹, 鲍彩彩¹, 王满侠^{1*}

¹兰州大学第二医院神经内科, 甘肃 兰州 730030

²兰州大学第一医院心内科, 甘肃 兰州 730030

摘要:【目的】通过建立实验性脑脊髓膜炎(EAE)小鼠模型, 观察小鼠肠道菌群在不同发病时间点的变化和炎症因子 IL-17、IFN- γ 的表达情况, 探讨肠道菌群的变化在 EAE 发病中的免疫调节作用。【方法】将 48 只 C57BL/6 小鼠按照随机数字表法分为正常对照组、EAE 模型组各 24 只。EAE 组采用 MOG₃₅₋₅₅ 与完全弗氏佐剂的混合物制备模型, 进行神经功能评分, 记录体重变化。分别取免疫后 7、14、21、30 d 的小鼠粪便, 对样本 DNA 的 16S rDNA V3/V4 区基因测序。ELASE 法检测 IL-17、IFN- γ 的表达。【结果】EAE 组小鼠血液中 IL-17、IFN- γ 的表达从第 7 天开始逐渐升高, 21 d 时达到高峰。14 d 时, EAE 组与正常对照组相比, 物种丰度有显著性差异($P < 0.05$)的菌种有: *Alistipes*、布牢特氏菌属、毛螺菌科_ *NK4A136_group* 等。30 d EAE 组与正常对照组相比, 物种丰度有显著性差异($P < 0.05$)的菌种有: *Allobaculum*、真细菌属、螺杆菌等。通过 LefSe 分析, 在 7、14、21 d 中分别主要作用的微生物菌种逐渐减少, 在 21 d 时最少。*Odoribacter* 在 21 d 时起了主要作用。【结论】与正常对照组相比, 14、21、30 d EAE 小鼠肠道菌种的丰度均发生了变化, 产生了肠道菌群的紊乱; 其中普雷沃氏菌属_ *NK3B1_group* 的丰度均较正常对照组降低, 与 IFN- γ 呈负相关($r = -0.537$, $P < 0.01$)。普雷沃氏菌属_ *NK3B1_group* 可能是导致 MS 脱髓鞘发生的关键菌属。EAE 组各个时间点相比起主要作用的肠道菌群种类减少, 多样性降低。其中, *Odoribacter* 是在 21 d 高峰期起主要作用的菌种, 但其作用机制需要深入研究。EAE 组中炎症因子 IL-17、IFN- γ 表达的升高, 促进了 MOG₃₅₋₅₅ 诱发的炎症反应。

关键词: 肠道菌群, 白介素 17, γ -干扰素, 实验性脑脊髓膜炎

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是中枢神经系统的炎性脱髓鞘性疾病, 是一种自身免疫性疾病, 具有缓解、复发的临床特点, 女性的发病率高于男性, 是引起青壮年神经功能障碍最主要的神

基金项目: 甘肃省自然科学基金(18JR3RA315); 甘肃省神经病学国际合作基地项目(甘科外【2017】2号-33)

*通信作者。Tel: +86-931-5190514; E-mail: wmx322@aliyun.com

收稿日期: 2018-12-26; 修回日期: 2019-03-09; 网络出版日期: 2019-06-17

经系统疾病^[1-2]。MS 的发病机制与基因和环境因素都有关系,例如 EB 病毒的感染、摄盐量、吸烟、青春期肥胖、酗酒、维生素 D 的缺乏等^[3-6],这些危险因素都与肠道菌群的失调有关^[7]。例如,维生素 D 的减少可以改变免疫反应,产生 Foxp3Treg 细胞,减少肠道 T 细胞,从而直接影响肠道菌群^[8]。同时,梭杆菌属缺乏、厚壁菌属和古生菌属增加时 MS 的复发率升高^[9]。目前认为,肠道定殖菌的紊乱是一种新的值得重视的导致 MS 的环境因素^[10]。

实验性变态反应性脑脊髓炎模型(experimental allergic encephalomyelitis, EAE)是目前公认的 MS 的理想动物模型,能很好地模拟人类 MS 的发生、发展和转归过程^[11]。本实验采用 EAE 模型动态研究在 MS 发病过程中小鼠肠道菌群和淋巴细胞相关的炎症因子变化特点,进一步探讨在 MS 发生、发展过程中肠道菌群紊乱的变化特点和作用机制,为在临床上如何更加有效地中断反复发作以及辅助进行 MS 的免疫治疗提供了研究基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 48 只,雌性,6-8 周龄,体重 16-18 g,购自甘肃省中医药大学动物研究中心,饲养于甘肃省中医药大学动物实验室(甘肃兰州)。按照随机数字表法分为正常对照组、EAE 模型组各 24 只。已通过兰州大学第二医院伦理委员会审核。

1.2 实验材料

MOG₃₅₋₅₅ 购自 CS Bio 公司,完全弗氏佐剂(5 mg/mL)购自 Sigma 公司,结核菌素 H37Ra 购自 Difco 公司,百日咳毒素购自 LBL 公司。酶联免疫法 IL-17、IFN- γ 试剂盒购自武汉博士德试剂公司。小鼠粪便基因 DNA 提取试剂盒(QIAGEN, 德国)。

1.3 EAE 模型制备

0.9%的生理盐水将 MOG₃₅₋₅₅ 稀释成 10 mg/mL,然后加入等体积的完全弗氏佐剂(CFA)和等量的结核菌素 H37Ra,于小鼠脊柱两旁分 4 点皮下注射 0.1 mL 的乳剂,之后分别在免疫当天及 48 h 分 2 次腹腔注射百日咳毒素 0.5 mL 作为免疫增强剂。

1.4 数据采集

从免疫后第 1 天开始,采用双盲法由两名观察者每天称量小鼠体重,采用国际通用的 5 分评分制对小鼠进行神经功能评分。评分标准:0 分:无任何症状;1 分:尾部张力消失,可见轻度步态笨拙;2 分:一侧后下肢无力,被动翻身后可以恢复;3 分:双后肢瘫痪,被动翻身后不能恢复,但给予刺激后可以挪动;4 分:双后肢瘫痪伴前肢瘫痪;5 分:濒死状态或死亡。

1.5 小鼠粪便留取

EAE 组分别于免疫后 7、14、21、30 d 留取小鼠粪便,每个时间点 3 个重复,每个样本 0.5 g,取样后迅速至于冻存管中,并迅速放入液氮速冻,之后转移至-80 °C 冰箱保存。

1.6 粪便细菌基因组 DNA 的提取

按试剂盒要求提取 DNA。PCR 扩增基因组 DNA,引物为细菌 16S rDNA V4 区特异性引物,扩增片段长度 250 bp,有效序列分布长度构建测序文库采用 Illumina MiSeq 平台测序,对高质量测序数据进行生物信息学分析,分类学分析采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97%相似性水平的 OTU 序列进行分类学分析,比对数据库为 Silva_12816SrRNA database。EAE 7 d 组、14 d 组分别与 30 d 组间菌落结构差异显著性分析采用 Metastats 软件,7、14、21、30 d 多组间比较用

LEfSE 在线分析软件。

1.7 酶联免疫法

EAE 组小鼠分别于后免疫第 7、14、21、30 天随机各 6 只小鼠取血, 分离血清, 酶联免疫法测定 IL-17、IFN- γ 的含量。具体方法参照试剂盒说明书。

1.8 统计学方法

得到的数据采用 SPSS 22.0 软件, 采用重复测量方差分析, 计量资料采用 $(\bar{X} \pm S)$ 表示组间分析用成组 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。相关性分析, 采用 Spearman 相关性分析。

2 结果和分析

2.1 小鼠临床症状评分与体重变化

EAE 组小鼠平均发病时间 7.70 ± 0.67 d, 21 d 时达高峰。发病时食欲下降, 体重减轻, 皮毛不光滑, 伴随有神经功能缺损症状出现, 起病时尾部张力下降, 身体向一侧倾倒, 双侧后肢无力, 逐渐前肢无力, 严重时死亡。EAE 组小鼠 14 d 神经功能评分 2.10 ± 1.58 , 21 d 神经功能评分 2.93 ± 1.43 , 两两比较 $P < 0.05$ 差异有统计学意义 (图 1)。EAE 组小鼠 14 d 体重 16.28 ± 0.23 g, 21 d 时体重 15.96 ± 0.45 g, 30 d 时体重 18.28 ± 0.41 g。14 d 组与 21 d 组相比 $P < 0.05$, 差异有统计学意义, 14 d 与 30 d 相比 $P < 0.01$, 差异有统计学意义。正常对照组与 EAE 组相比, 在 14、21、30 d 相比, $P < 0.01$, 差异有统计学意义 (图 2)。

2.2 IL-17、IFN- γ 的检测结果

ELISA 试剂盒检测 IL-17、IFN- γ 的表达。EAE 组血清中 IL-17 的浓度 21 d 明显高于 14 d 和 30 d 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3)。IFN- γ 的浓度在 21 d 时最高, 与 14 d 和 30 d 组相比, 差异

也有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 肠道微生物测序结果

根据 16S rRNA 测序结果, 采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似性水平的 OTU 序列进行分

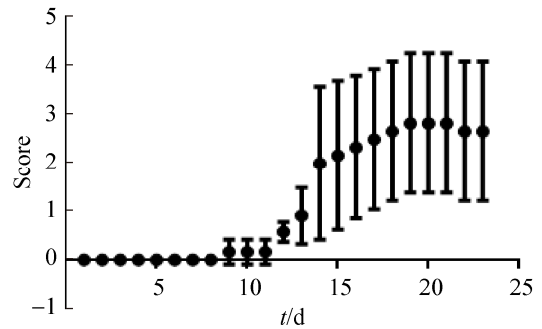


图 1. EAE 组小鼠神经功能评分变化趋势图

Figure 1. EAE groups neurological scores in days. $P < 0.01$.

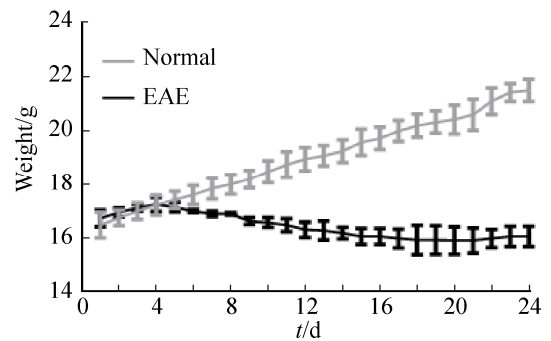


图 2. 正常对照组、EAE 组体重变化趋势图

Figure 2. The weights of normal group and EAE group in days. $P < 0.05$.

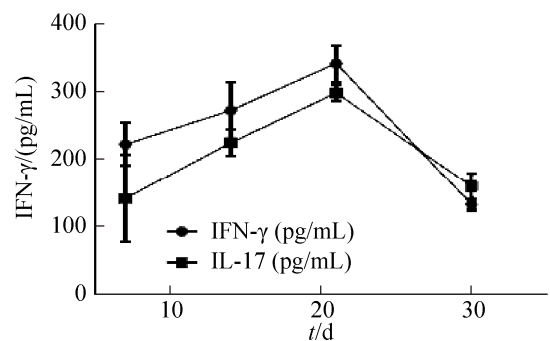


图 3. IFN- γ 、IL-17 的浓度 21 d 与 14 d 和 30 d 相比较

Figure 3. Compared the expression of IFN- γ and IL-17 in 21 days, 14 days and 30 days. $P < 0.01$.

类学分析，比对数据库 Silva_128 16S rDNA database，得到了 EAE 组和正常对照组粪便共 OTU221，15 个界，125 个门，189 个纲，189 个目，336 个科，688 个属，38 个种。

2.3.1 物种相对丰度：采用 R 语言作图在属水平上 TOP 30 物种分布柱状图(图 4)，其中以拟杆菌属、普雷沃氏菌属、瘤胃球菌属、*Alistipes*、毛螺菌属、拟普雷沃菌属含量较高。

2.3.2 主坐标分析(PCoA)：对所有样本进行主坐标分析，图中一个点代表一个样品，颜色相同的点属于同一种分组，两个点之间的距离越近，说明两个样品的微生物群落差异越小(图 5)。采用主成分 PC1 和次要成分 PC2 分析；PC1 贡献度为 23.71%，PC2 贡献度为 20.03%。各组样本位于不

同的象限中，差异较大。

2.3.3 组间菌落结构差异显著性分析结果：

Metastats 差异分析：14 d 时，EAE 组与正常对照组相比，物种丰度有显著性差异($P<0.05$)的菌种有：*Alistipes*、布牢特氏菌属、毛螺菌属、*NK4A136_group*、普雷沃氏菌属、*NK3B31_group*、普雷沃氏菌属、*UCG-001* (图 6)。30 d 时 EAE 组与正常对照组相比，物种丰度有显著性差异($P<0.05$)的菌种有：*Allobaculum* (支原体科)、真菌属、螺杆菌、*Parasutterella*、普雷沃氏菌属(图 7)。LEfSE 差异分析(图 8)：在 7 d 组起主要作用的微生物群是瘤胃球菌属、变形菌属、弯曲菌目、螺杆菌科，14 d 组伯克氏菌目、*parasutterella*、 β -变性菌、产碱杆菌属，21 d 组 *Odoribacter*。

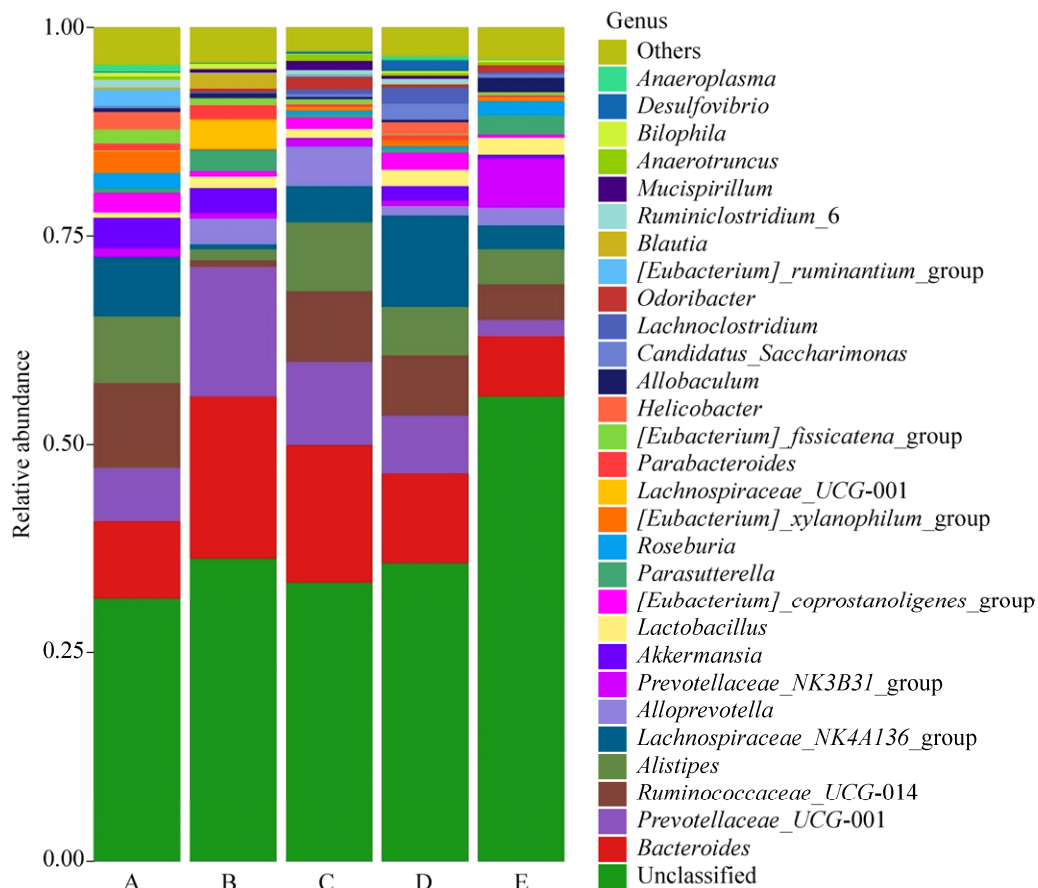


图 4. TOP30 物种分布柱状图

Figure 4. Relative abundance of top 30 (genus level). A: 7 days; B: 14 days; C: 21 days; D: 30 days; E: normal group.

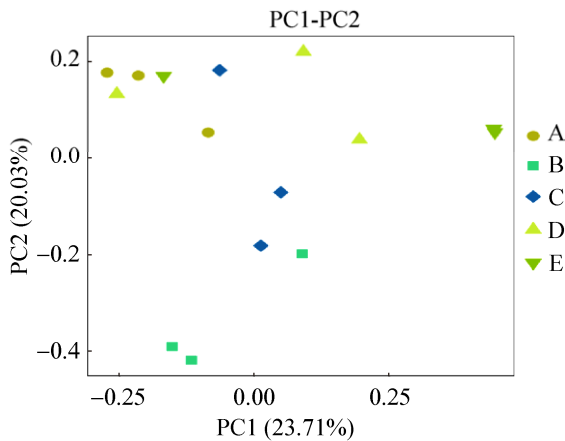


图 5. 各样本的主坐标分析
Figure 5. PCoA of samples. A: 7 days; B: 14 days; C: 21 days; D: 30 days; E: normal group.

2.4 相关性分析

普雷沃氏菌属 *NK3B31_group* 的丰度均较正常对照组降低, 与 $\text{IFN-}\gamma$ 呈负相关($r=-0.537, P<0.01$)。

3 讨论

肠道作为人体最大的微生物定殖场所, 肠道菌

群参与宿主的多项生理过程, 在保护肠道屏障、抑制病原微生物和全身免疫反应的形成中起了重要作用^[12]。随着微生物-肠-脑轴 (microbiome-gut-brain axis, MGBA) 的发现, 逐渐开始关注其在 MS 发病过程中的作用。研究发现 MS 患者肠道中甲烷短杆菌和艾克曼菌属含量增加, 它们可以刺激机体 T 细胞和单核细胞分化, 因而激活天然和获得性免疫系统。然而予以 DMT (disease-modifying treatment) 干预后, 患者肠道菌群中普式菌属和萨特氏菌属含量增加, 八叠球菌属含量下降^[13]。因而, 肠道菌群失调可能在多发性硬化病程中起到重要作用。

目前认为, 肠道菌群可能通过调节淋巴细胞分化、炎症因子、代谢产物、破坏血脑屏障等机制参与了 MS 的发生发展过程^[14]。在本研究中采用 MOG 作为抗原诱导 EAE 模型, 深入研究了肠道菌群在 MS 中的作用机制。MOG₃₅₋₅₅ 特异性活化 T 淋巴细胞, 活化的 T 细胞可能通过受损的血

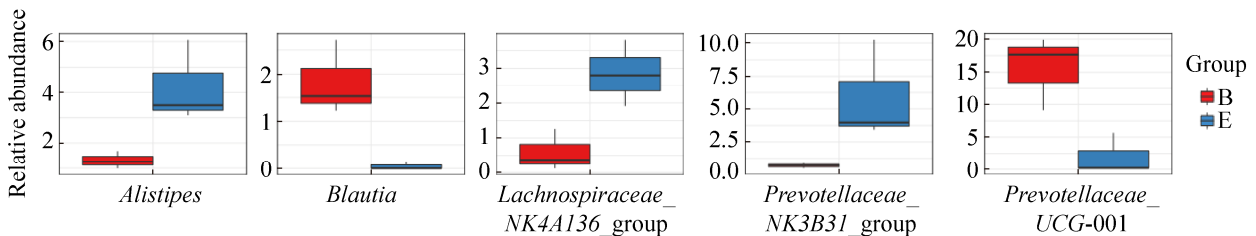


图 6. 组间菌落结构 Metastats 差异显著性分析结果

Figure 6. Metastats difference analysis. EAE group 14 days vs. normal groups, $P<0.05$. B: 14 days; E: normal groups.

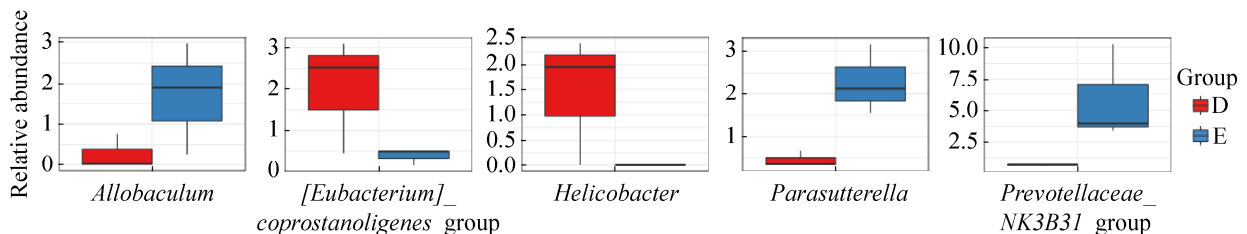


图 7. 组间菌落结构 Metastats 差异显著性分析结果

Figure 7. Metastats difference analysis. EAE group 30 days vs. normal groups, $P<0.05$. D: 30 days; E: normal groups.

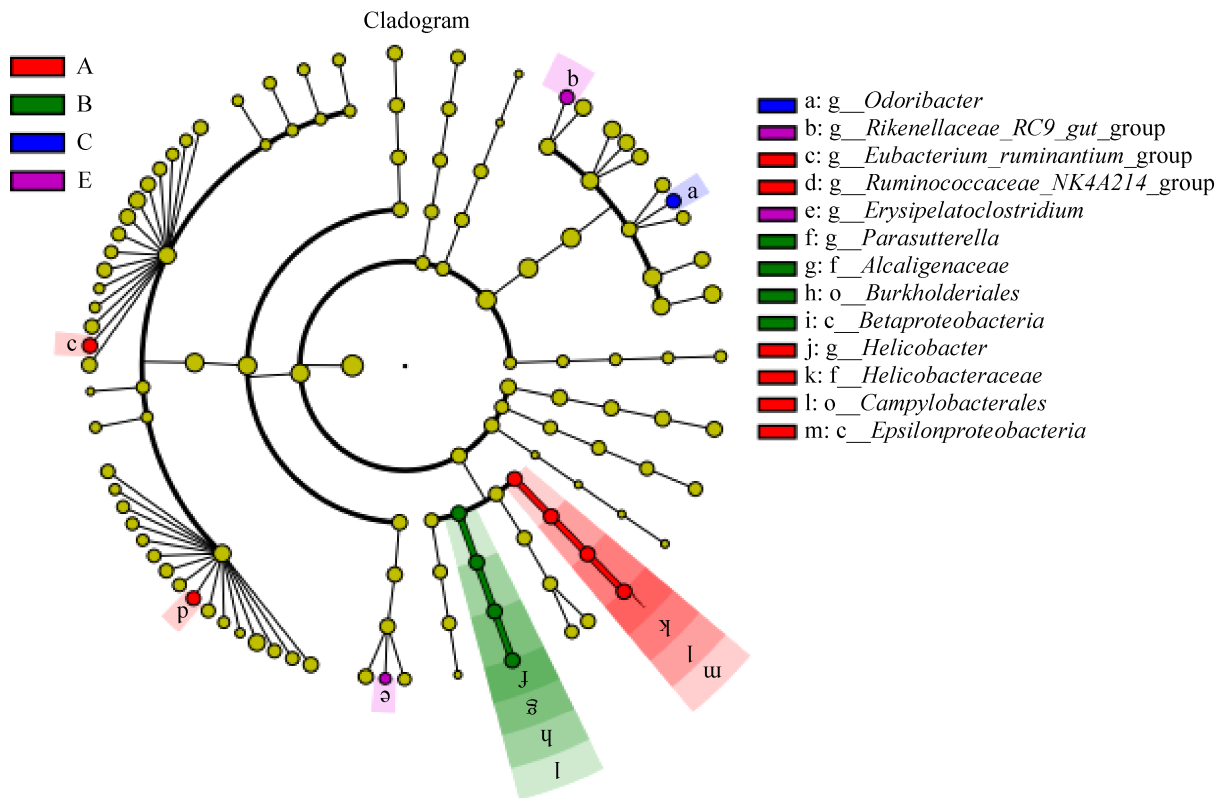


图 8. LEfSE 差异分析结果

Figure 8. LEfSE difference analysis. A: 7 days; B: 14 days; C: 21 days; D: 30 days; E: normal group.

脑屏障(blood brain barrier, BBB)进入中枢神经系统, 释放细胞因子, 引起脑部的病变。选用的 C57BL/6 小鼠, 诱发的 EAE 呈慢性单相病程, CNS 病灶呈多发性, 主要位于白质, 大脑、小脑、脑干及脊髓均有不同程度受累。EAE 组的临床评分变化趋势及平均值如图 1, 可以看到平均发病时间 7.700 ± 0.674 d, 在 21 d 左右达到高峰, 7、14、21 d 三个时间点相比临床评分差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。体重的变化在正常对照组与 EAE 组, 在 14、21、30 d 组间比较, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。EAE 组体重的变化趋势与临床评分的变化趋势一致。本研究中炎症因子 IL-17、IFN- γ 两者在 21 d 时最高, 在各个时间点相比 $P < 0.05$, 差异有统计学意义。这说明, 被动免疫 PLP 导致的炎性脱髓鞘反应上调了 γ 型的 IFN 的浓度, 其介导

JAK/STAT1 信号通路, 是通过 JAK/STAT1-SOCS3 信号通路中抑制免疫的重要因子。

本研究采用 16S rDNA 测序, 采用 R 语言作图, 各个样本在属水平上 TOP 30 物种丰度分布柱状图(图 8), 以多形杆菌属、普雷沃氏菌属、瘤胃菌属、另枝菌属、毛螺旋菌属、*Alloprevotella* 丰度较高, 是优势菌群。这与以往的研究 MS 患者肠道菌群中厚壁菌属和古生菌属、普式菌属、萨特氏菌属含量增加时引起肠道及中枢神经系统炎症, MS 容易复发的结果相一致^[9]。14 d 时, EAE 组与正常对照组相比, 物种丰度有显著性菌种是: *Alistipes*、布牢特氏菌属、毛螺菌属、*NK4A136_group*、普雷沃氏菌属、*NK3B31_group*、普雷沃氏菌属、*UCG-001*。30 d 时 EAE 组与正常对照组相比, 有显著性差异的菌种有: *Allobaculum* (支原体科)、

真细菌属、螺杆菌、*Parasutterella*、普雷沃氏菌属 *_NK3B31_group*。不同的时间点与正常对照组相比, 有显著性差异的菌种不同, 因此存在肠道菌群结构的紊乱。可见, EAE 小鼠肠道菌群结构的紊乱与炎症脱髓鞘的发生密切相关。其中普雷沃氏菌属 *_NK3B31_group* 的丰度在 14 d 组、30 d 组均较正常对照组降低。普雷沃氏菌被认为与短链脂肪酸的合成一致^[15], Haghikia 等的研究发现低链脂肪酸可以抑制炎症反应, 同时发现中长链脂肪酸可以促使 T 细胞分化为 Th17、Th1 细胞。短链脂肪酸也可以促进 TGFβ1 的表达, 从而诱导 Treg 细胞的分化。由此可见短链脂肪酸在中枢神经系统疾病中起到抑制免疫反应的作用^[16]。通过相关性分析发现与 IFN-γ、IL-17 呈负相关。如前所述 IFN-γ 在肠道菌群紊乱的多发性硬化患者中表达显著增加, IFN-γ 是典型的 Th1 型细胞因子, 促进淋巴毒素或肿瘤坏死因子等介质的释放, 引起脱髓鞘改变^[17], 可以加重多发性硬化的疾病进展^[18]。IL-17 是 Th17 分泌的, 是早期产生的具有广泛生物学活性的炎性细胞因子^[19]。IL-17 受体存在于血脑屏障内皮细胞上, 肠道菌群紊乱后, 血液系统中 IL-17 增加, 随着血液循环到达中枢的 IL-17 可通过血脑屏障内皮细胞上的受体直接穿过 BBB^[20]。这说明肠道菌群及其相关炎症介质可能通过直接穿过 BBB、改变 BBB 的完整性、增加血脑屏障的通透性或者直接刺激各种神经免疫物质等方式, 参与 MS 的发生发展过程^[21]。普雷沃氏菌属 *_NK3B31_group* 的丰度的变化可能与上调血液中的炎症因子 IFN-γ、IL-17 的含量有关, 导致肠道菌群的含量紊乱, 继而又作用于中枢神经系统导致炎症脱髓鞘的形成, 证实了 MGBA^[22] 的存在。在本研究中 LEfSE 差异分析的结果显示, 在 21 d 起主要作用的菌属是 *Odoribacter*。目前对

于 *Odoribacter* 的研究较少, *Odoribacter* 是紫单胞菌科, 具体作用机制有待于进一步深入研究。

本实验主要侧重于炎症因子与肠道菌群在实验性脑脊髓膜炎关系中的作用及其机制进行了相关研究。γ 型的 IFN、IL-17 是在 JAK/STAT1-SOCS3 信号通路中抑制免疫的重要因子。肠道菌群结构的紊乱、菌群丰度的减少对 EAE 小鼠中淋巴细胞的分化、炎症因子表达的影响产生了重要的作用。肠道菌群可能从多个方面参与了 MS 的复发-缓解的病程, 通过本研究发现的在 EAE 发病过程中起密切相关的肠道菌群, 如普雷沃氏菌属 *_NK3B31_group*、*Odoribacter*, 具体的作用机制有待于进一步的深入研究, 通过探索靶向调整肠道菌群的药物为 MS 的免疫治疗提供更多的方式。

参 考 文 献

- [1] Dilokthornsakul P, Valuck RJ, Nair KV, Corboy JR, Allen RR, Campbell JD. Multiple sclerosis prevalence in the United States commercially insured population. *Neurology*, 2016, 86(11): 1014–1021.
- [2] Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, Fisk JD, Evans C, Béland SG, Kulaga S, Dykeman J, Wolfson C, Koch MW, Marrie RA. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurology*, 2013, 13: 128.
- [3] Tao C, Simpson S Jr, van der Mei I, Blizzard L, Havrdova E, Horakova D, Shaygannejad V, Lugeschi A, Izquierdo G, Trojano M, Duquette P, Girard M, Grand'Maison F, Grammond P, Alroughani R, Terzi M, Oreja-Guevara C, Sajedi SA, Iuliano G, Sola P, Lechner-Scott J, Pesch VV, Pucci E, Bergamaschi R, Barnett M, Ramo C, Singhal B, LA Spitaleri D, Slee M, Verheul F, Fernández Bolaños R, Amato MP, Cristiano E, Granella F, Hodgkinson S, Fiol M, Gray O, McCombe P, Saladino ML, Sánchez Menoyo JL, Shuey N, Vucic S, Shaw C, Deri N, Arruda WO, Butzkueven H, Spelman T, Taylor BV. Higher latitude is significantly associated with an earlier age of disease onset in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2016, 87(12): 1343–1349.

- [4] Brooks WH, Le Dantec C, Pers JO, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 2010, 34(3): J207–J219.
- [5] Selmaj I, Mycko MP, Raine CS, Selmaj KW. The role of exosomes in CNS inflammation and their involvement in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 2017, 306: 1–10.
- [6] Brenton JN, Goldman MD. A study of dietary modification: perceptions and attitudes of patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 2016, 8: 54–57.
- [7] Joscelyn J, Kasper LH. Digesting the emerging role for the gut microbiome in central nervous system demyelination. *Multiple Sclerosis Journal*, 2014, 20(12): 1553–1559.
- [8] Ly NP, Litonjua A, Gold DR, Celedón JC. Gut microbiota, probiotics, and vitamin D: interrelated exposures influencing allergy, asthma, and obesity? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011, 127(5): 1087–1094.
- [9] Tremlett H, Fadrosh DW, Faruqi AA, Hart J, Roalstad S, Graves J, Lynch S, Waubant E. Gut microbiota composition and relapse risk in pediatric MS: a pilot study. *Journal of the Neurological Sciences*, 2016, 363: 153–157.
- [10] Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, Debelius JW, Singh S, Nelson CA, Kanner R, Bencosme Y, Lee YK, Hauser SL, Crabtree-Hartman E, Sand IK, Gacias M, Zhu YJ, Casaccia P, Cree BAC, Knight R, Mazmanian SK, Baranzini SE. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(40): 10713–10718.
- [11] Stefferl A, Brehm U, Linington C. The myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG): a model for antibody-mediated demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 2000, (58): 123–133.
- [12] Barreau F, Meinzer U, Chareyre F, Berrebi D, Niwa-kawakita M, Dussaillant M, Foligne B, Ollendorff V, Heyman M, Bonacorsi S, Lesuffleur T, Sterkers G, Giovannini M, Hugot JP. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS One*, 2007, 2(6): e523.
- [13] Jangi S, Gandhi R, Cox LM, Li N, von Glehn F, Yan R, Patel B, Mazzola MA, Liu SR, Glanz BL, Cook S, Tankou S, Stuart F, Melo K, Nejad P, Smith K, Topçuoğlu BD, Holden J, Kivisäkk P, Chitnis T, de Jager PL, Quintana FJ, Gerber GK, Bry L, Weiner HL. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature Communications*, 2016, 7: 12015.
- [14] Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(9): 545–558.
- [15] Chen J, Chia N, Kalari KR, Yao JZ, Novotna M, Paz Soldan MM, Luckey DH, Marietta EV, Jeraldo PR, Chen XF, Weinschenker BG, Rodriguez M, Kantarci OH, Nelson H, Murray JA, Mangalam AK. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28484.
- [16] Haghikia A, Jörg S, Duscha A, Berg J, Manzel A, Waschbisch A, Hammer A, Lee DH, May C, Wilck N, Balogh A, Ostermann AI, Schebb NH, Akkad DA, Grohme DA, Kleinewietfeld M, Kempa S, Thöne J, Demir S, Müller DN, Gold R, Linker RA. Dietary fatty acids directly impact central nervous system autoimmunity via the small intestine. *Immunity*, 2016, 44(4): 951–953.
- [17] Barreau F, Madre C, Meinzer U, Berrebi D, Dussaillant M, Merlin F, Eckmann L, Karin M, Sterkers G, Bonacorsi S, Lesuffleur T, Hugot JP. *Nod2* regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut*, 2010, 59(2): 207–217.
- [18] Steinman L. Erratum: a brief history of T_H17, the first major revision in the T_H1/T_H2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Medicine*, 2007, 13(3): 385.
- [19] Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 Suppl 1: 4615–4622.
- [20] Ma JY, Zhang RX, Cheng XD. Correlation between serum cytokine IL-17 and demyelinating neuropathy multiple sclerosis: a meta-analysis. *Chinese Journal of Immunology*, 2017, 33(12): 1832–1837. (in Chinese)
马金驹, 张若曦, 程晓东. 血清细胞因子 IL-17 与脱髓鞘性神经病多发性硬化相关性的研究: Meta 分析. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(12): 1832–1837.
- [21] Pan W, Banks WA, Kennedy MK, Gutierrez EG, Kastin AJ. Differential permeability of the BBB in acute EAE: enhanced transport of TNT- α . *American Journal of Physiology*, 1996, 271(4): E636–E642.
- [22] Galland L. The gut microbiome and the brain. *Journal of Medicinal Food*, 2014, 17(12): 1261–1272.

Correlation of gut microbiota with IL-17 and IFN- γ in experimental autoimmune encephalomyelitis

Xiaoling Li¹, Bo Zhang², Mengjiao Sun¹, Caicai Bao¹, Manxia Wang^{1*}

¹ Neurology Department, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

² Cardiology Department, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] To explore the immune regulatory effect of gut microbiota in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), we studied the change of gut microbiota and its correlation with the production of IL-17 and IFN- γ at different times. [Methods] Female C57BL/6 mice were divided randomly into 2 groups: the normal group and EAE. EAE was induced with MOG₃₅₋₅₅ mixed with complete Freund's adjuvant. The weight and neurological scores of 2 groups were observed. The 16S rDNA V3/V4 region of DNA of gut microbiota was identified by the Illumina Mi Seq high-throughput sequencing. IL-17 and IFN- γ in the blood were detected by ELSIA. [Results] The production of IL-17 and IFN- γ reached the peak on day 21. The abundance of *Alistipes*, *Blautia* and *Lachnospiraceae_NK4A136_group* in EAE were different from the normal group on day 14. However, the abundance of *Allobaculum*, *Eubacterium*, *Helicobacter* were significantly changed on day 30. According to LefSe analysis, the microbial strains that were mainly affected on 7 day, 14 day and 21 day gradually decreased, and dropped the least on 21 day. *Odoribacter* played an important role on 21 day. Compared with the normal group, the abundance and diversity of gut microbiota in EAE changed. The abundance of *Prevotellaceae_NK3B31_group* in EAE was lower than the normal group, and related negatively with the production of IFN- γ ($r=-0.537$, $P<0.01$). *Prevotellaceae_NK3B31_group* maybe the key bacteria that caused the demyelination of MS. [Conclusion] The abundance and diversity of gut microbiota played the important role at the different times in the EAE group. The production of IL-17 and IFN- γ led to the inflammatory of EAE that induced by MOG₃₅₋₅₅.

Keywords: gut microbiota, IL-17, IFN- γ , experimental autoimmun encephalomyelitis

(本文责编: 李磊)

Supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province, China (18JR3RA315) and by the Gansu International Science and Technology Cooperation Base for Precise Diagnosis and Treatment of Neurological Diseases ([2017]2-33)

*Corresponding author. Tel: +86-931-5190514; E-mail: wmx322@aliyun.com

Received: 26 December 2018; Revised: 9 March 2019; Published online: 17 June 2019

王满侠, 教授, 主任医师, 博士生导师, 兰大二院神经内 2 病区主任, 甘肃省医师协会神经内科医师分会会长, 神经感染与免疫亚专业带头人, 甘肃省神经病学精准诊疗国际合作基地负责人, 兰州大学临床医学研究型神经病学学科负责人, 国家神经感染与免疫分中心负责人, 中国免疫学会神经免疫分会委员, 中华医学会神经病学分会神经免疫学组委员, 中国卒中学会神经免疫分会常委, 中国医师协会神经内科医师分会西部论坛专家委员会副主任委员, 《中国神经免疫学和神经病学》杂志编委, 《中国免疫学》杂志特约审稿专家。主持完成科研多项, 其中 10 余项分别获甘肃省科技进步二等奖, 甘肃省医学科技进步二、三等奖, 甘肃省皇甫谧中医药科技进步三等奖等, 正式公开发表论文 50 余篇。

