

网络出版时间:2022-8-16 13:15 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220816.0833.020.html

抗生素对大鼠肠道菌群和认知行为的影响

李艳丽¹, 杨小荣², 张策², 郭军红¹

摘要 目的 探讨广谱抗生素处理后,大鼠肠道菌群的变化、恢复及其对认知行为是否产生影响。方法 实验大鼠随机分为抗生素处理(AT)组和对照(Control)组;AT组用氨苄青霉素、万古霉素、甲硝唑和亚胺培南4种抗生素混合液灌胃3 d,Control组用等量的生理盐水灌胃。在第4天(距最后一次抗生素处理24 h)及2个月时收集粪便进行16s rRNA基因测序检测肠道菌群的变化;在2个月时通过基于操作条件反射的延迟匹配样本任务(DMTP)和Y迷宫检测两组大鼠认知行为。结果 第4天AT组大鼠肠道菌群减少,包括菌群多样性减少($P < 0.0001$);优势菌拟杆菌门数量减少($P < 0.0001$),厚壁菌门数量减少($P = 0.0001$);而变形菌门相对丰度增加($P < 0.0001$)。停用抗生素后肠道菌群恢复,在2个月时与Control组比较差异无统计学意义;且AT组大鼠的认知行为与Control组比较差异亦无统计学意义。结论 广谱抗生素处理会引起大鼠肠道菌群减少,但这种减少是暂时的,在停用抗生素后会恢复正常,并且不会影响大鼠的工作记忆和空间记忆。

关键词 抗生素;肠道菌群;认知行为;DMTP;Y迷宫

中图分类号 R 338.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1447-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.020

在人体肠道生活着100万亿个微生物,是人体细胞总数的10倍,被称为肠道微生物或肠道菌群^[1]。抗生素作为干预肠道菌群的主要方式之一,会引起肠道菌群失调,影响认知行为。研究^[2]表明,联合抗生素(氨苄青霉素、杆菌肽、美罗培南、新霉素和万古霉素)处理可使小鼠新物体识别记忆受损。氨苄青霉素处理引起小鼠空间记忆和新物体识别记忆缺陷^[3]。但是这些研究并未报道抗生素处理后肠道菌群是否恢复以及对认知行为的长期影

响。该研究通过4种广谱抗生素联合应用观察大鼠肠道菌群的变化、恢复及对认知行为的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 3月龄SPF级雄性SD大鼠($n = 12$),体质量280~300 g,购自长沙天勤生物技术有限公司[许可证号为SCXK(湘)2014-0010]。所有大鼠在山西医科大学实验动物中心饲养,每笼2只,环境温度20~22℃,湿度50%,昼夜明暗交替时间为12 h/12 h。食物和水经高压灭菌,所有动物自由进食和水。

实验大鼠随机分两组,每组6只。一组为抗生素处理(AT)组,用抗生素混合液灌胃3 d。抗生素混合制剂为:氨苄青霉素[180 mg/(kg·d),山东鲁抗医药股份有限公司],万古霉素[72 mg/(kg·d),华北制药股份有限公司],甲硝唑[90 mg/(kg·d),陕西必康制药集团控股有限公司]和亚胺培南[90 mg/(kg·d),杭州默沙东制药有限公司],每天2次(间隔12 h),每次灌胃2 ml,持续3 d,之后常规饲养至2个月。另一组为对照(Control)组,灌胃等量的生理盐水持续3 d,之后常规饲养至2个月。在第4天(距最后一次抗生素处理24 h)收集粪便进行肠道菌群检测。在2个月时进行肠道菌群和认知行为的检测。

1.2 粪便样本采集 在第4天(距最后一次抗生素处理24 h)和2个月时分别收集粪便进行肠道菌群检测。采集粪便前,紫外消毒通风橱处理30 min。采集时,带上无菌手套,在通风橱收集大鼠粪便0.5~10 g,装入无菌冻存管,立即放在冰上并做好标记,迅速放入液氮中,收集完后立即放入-80℃冰箱保存。

1.3 16s rRNA基因测序 用粪便DNA提取试剂盒(生产批号154041641,德国Qiagen公司)提取各样本微生物组总DNA,委托上海派森诺生物科技股份有限公司在Illumina MiSeq高通量测序平台进行高通量测序。使用QIIME2软件和VSEARCH软件进行序列去噪和可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类。使用R软件包(v3.1.1)计

2022-02-21 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81871125,82101641);细胞生理学教育部重点实验室(山西医科大学)开放基金(编号:KLMEC/SXMU-202010);山西省回国留学人员科研资助项目(编号:HGKY2019054)

作者单位:¹山西医科大学第一医院神经内科,太原 030001

²山西医科大学生理学系,细胞生理学教育部重点实验室,太原 030001

作者简介:李艳丽,女,博士,责任作者,E-mail:liyanli_01@163.com

算 OTU 数量和 Shannon 多样性指数。使用 R 软件包进行基于加权 UniFrac 距离的非度量多维尺度 (nonmetric multidimensional scaling, NMDS) 分析, 显示样本间 OTU 组成的差异。使用 RDP Classifier 软件 v. 2. 2 对 OTU 代表性序列进行物种水平的分类, 置信阈值 80%。在 R (v3. 1. 1) 软件进行统计分析^[4]。

1.4 基于操作条件反射的延迟匹配样本任务 (delayed matching to position, DMTP) 检测 在操作条件反射测试室 (MED-007-CT, 美国 Med Associates 公司, 图 1A), 通过基于操作条件反射的 DMTP 检测大鼠的工作记忆 (图 1B)。在训练开始前 5 d, 限制大鼠饮食, 使其体质量维持在原体质量的 80% ~ 85%, 但不限制饮水, 直至行为实验结束。

训练阶段程序: ① 首先进行食槽训练, 每次实验时长 64 min, 包括 38 粒食物颗粒, 间隔 (100 ± 40) s; ② 压杆训练, 每次随机伸出左杆/右杆, 老鼠压杆后获得一次食物奖励, 每次实验时长 30 min, 包含 50 次压杆。

延迟匹配任务: 包括 3 个阶段即样本阶段、延迟阶段和选择阶段 (图 1B)。样本阶段: 房灯亮, 实验开始, 一个杆伸出 (左右随机, 此杆为“sample”杆), 老鼠压杆, 杆回缩, 开始计时延迟。延迟阶段: 鼠要鼻触食槽, 延迟后的第 1 次鼻触, 左右两杆同时伸出, 进入选择阶段。选择阶段: ① 鼠压正确杆 (样本阶段“sample”杆为正确杆), 两杆回缩, 奖励食物颗粒, 5 s 间隔后, 进行下一次测试; ② 鼠压错误杆, 两杆回缩, 房灯灭 5 s, 即“timeout”期。开始训练时, 延迟设为 0 s。如果连续 2 次实验正确率达 80% 以上, 进入延迟 1。延迟 1, 延迟设为 0 s、1 s、2 s、3 s、4 s、5 s、6 s、7 个延迟为一组 (block), 一组中每个延迟随机出现且每个延迟只出现一次, 7 个延迟后进入下一组。如果连续 2 次实验正确率达 80% 以上, 进入延迟 2。延迟 2 设为 0 s、1 s、2 s、4 s、8 s、12 s、16 s。如果连续 2 次实验正确率达 80% 以上, 开始测试实验, 延迟设为 0 s、2 s、4 s、8 s、12 s、18 s、24 s, 连续测试 5 个实验, 记录每个延迟的正确率。在抗生素处理后 2 个月时进行测试实验。

1.5 Y 迷宫检测 Y 迷宫 (XR-XY1032, 上海欣软信息科技有限公司) 共 3 个臂, 各个臂夹角 120°, 每一臂尺寸 60 cm × 10 cm × 35 cm (长 × 宽 × 高)。实验时在迷宫各个臂内贴上不同几何图形, 作为视觉标记。Y 迷宫检测大鼠的空间记忆。实验分 2 个阶段。第 1 个阶段为训练期, 用隔板挡住一个臂 (此

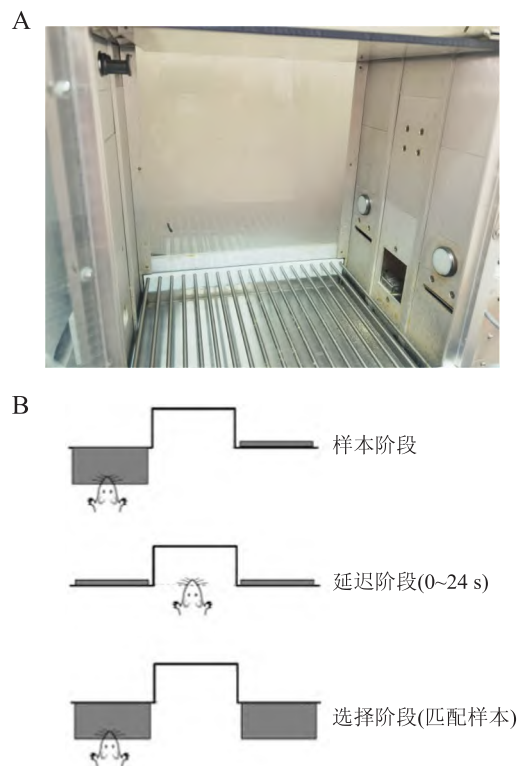


图 1 基于操作条件反射的 DMTP
A: 操作条件反射测试室; B: DMTP 检测程序

臂为新异臂), 大鼠由起始臂背对迷宫的中心放入, 在起始臂和其他臂自由探索 10 min, 然后取出; 间隔 1 h 后, 开始第 2 个阶段为测试期, 打开新异臂, 大鼠仍由起始臂放入, 在 3 个臂探索 5 min。记录大鼠进入每个臂的次数及在每个臂的持续时间。每次实验的新异臂与起始臂随机设置, 且每组样本新异臂在起始臂的左侧和右侧动物数相等。在抗生素处理后 2 个月时进行。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行分析处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。DMTP 比较采用重复测量双因素方差分析, 其余采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗生素处理减少大鼠肠道菌群数量 用氨苄青霉素、万古霉素、甲硝唑和亚胺培南 4 种抗生素联合处理 3 d 可减少大鼠肠道菌群数量。与 Control 组比较, AT 组大鼠肠道菌群 OTU 数量明显减少 (见图 2A)。

从 Rarefaction 稀疏曲线可以看出, 随测序量不断增加, 稀疏曲线变缓, 序列深度足够, 可以反映当前样品所包含的多样性 (见图 2B)。Control 组大鼠

Shannon 指数为 (7.93 ± 0.41) , AT 组大鼠 Shannon 指数 (3.64 ± 0.57) 降低, 差异有统计学意义 ($t = 13.18, P < 0.0001$)。

基于 UniFrac 距离的 NMDS 结果表明, AT 组大鼠肠道菌群 (AT-1) 与 Control 组 (Control-1) 不同 (见图 2C)。在门水平, 共检测出 15 个门。其中拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*) 之和占 0.90 以上, 是大鼠粪便中主要的优势菌门。与 Con-

trol 组比较, AT 组 *Bacteroidetes* 减少, 差异有统计学意义 ($t = 9.891, P < 0.0001$, 见图 2D); *Firmicutes* 减少, 差异有统计学意义 ($t = 7.397, P = 0.0001$, 见图 2D); 而变形菌门 (*Proteobacteria*) 增加, 差异有统计学意义 ($t = 18.37, P < 0.0001$, 见图 2D)。在属水平, AT 组大鼠 *Prevotella*、*Blautia*、*Phascolarctobacterium*、*Sutterella*、*Bacteroides*、*Ruminococcus*、*Parabacteroides* 数量减少 (见图 2E、F)。

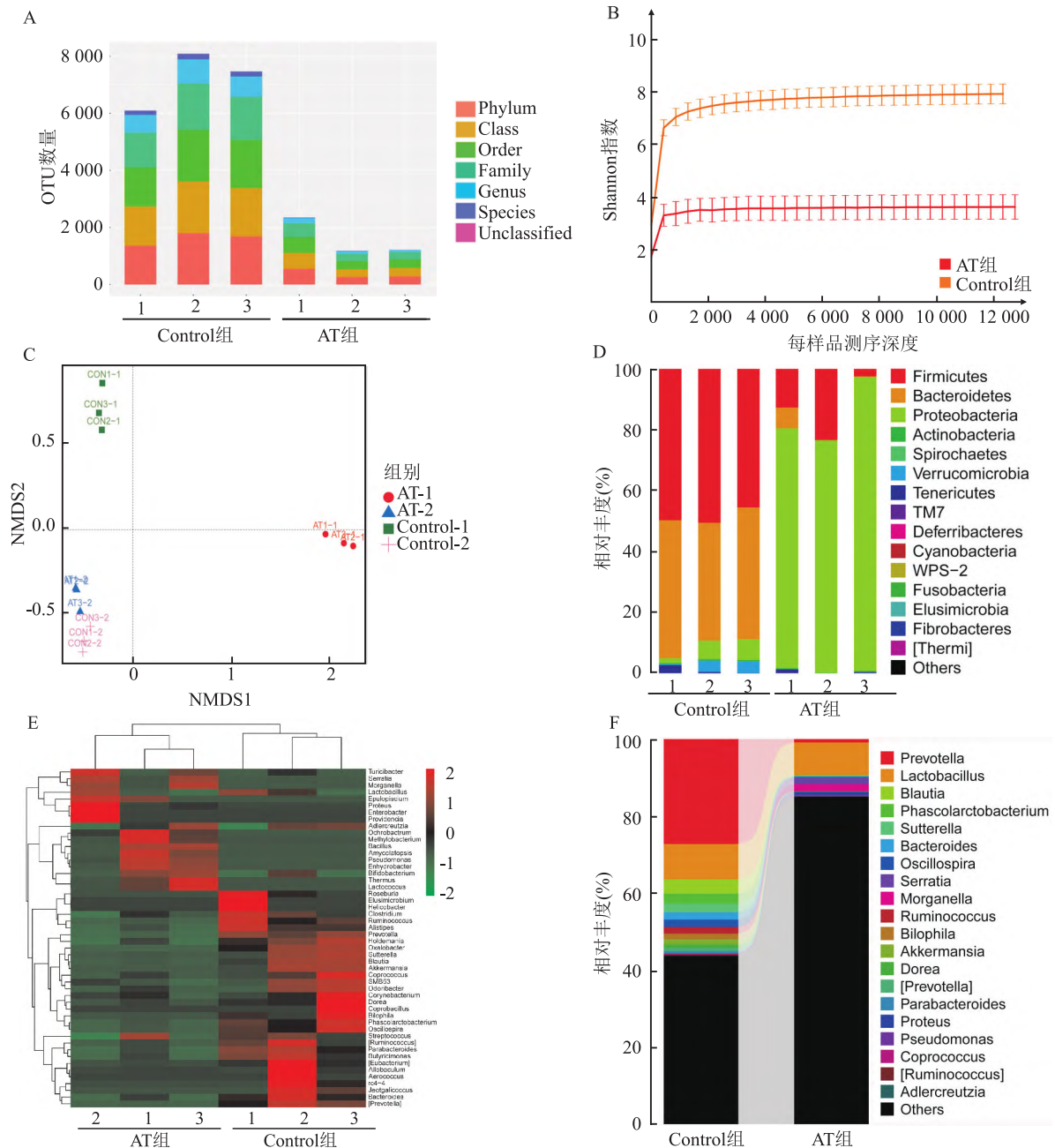


图2 第4天 AT 组和 Control 组大鼠的肠道菌群差异

A: 各分类水平的 OTU 数; B: Rarefaction 稀疏曲线; C: Weighted UniFrac NMDS 分析的样本二维排序图, AT-1: 第4天 AT 组大鼠肠道菌群, Control-1: 第4天 Control 组大鼠肠道菌群, AT-2: 抗生素处理后2个月 AT 组大鼠肠道菌群, Control-2: 抗生素处理后2个月 Control 组大鼠肠道菌群; D: 门水平的菌群组成和丰度分布图; E: 结合聚类分析的属水平群落结构热图; F: 属水平的菌群组成和丰度分布图

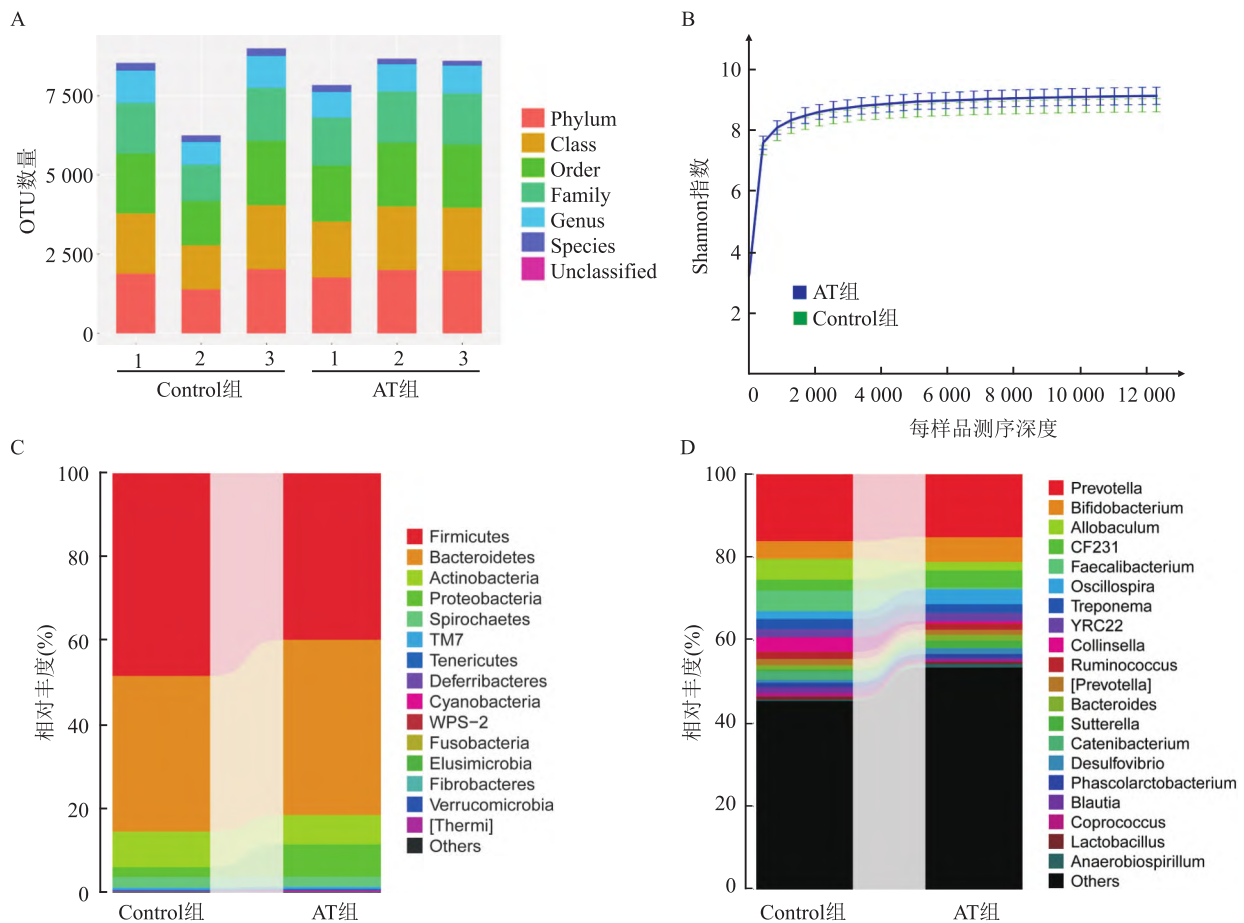


图3 抗生素处理后2个月AT组和Control组大鼠的肠道菌群

A:各分类水平的OTU数;B:Rarefaction稀疏曲线;C:门水平的菌群组成和丰度分布图;D:属水平的菌群组成和丰度分布图

2.2 抗生素处理后2个月大鼠肠道菌群恢复 抗生素处理后2个月AT组大鼠肠道菌群OTU数量恢复,与Control组比较差异无统计学意义(见图3A)。肠道菌群多样性也恢复,Control组Shannon指数为(8.83 ± 0.24),AT组Shannon指数为(9.13 ± 0.34),两组比较差异无统计学意义(见图3B)。

基于UniFrac距离的NMDS结果表明,抗生素处理后2个月AT组(AT-2)肠道菌群可以恢复,与Control组(Control-2)比较差异无统计学意义(见图2C)。在门水平,2个月后拟杆菌门和厚壁菌门数量恢复,与Control组比较差异无统计学意义(见图3C)。在属水平,2个月后 *Prevotella*、*Ruminococcus*、*Bacteroides*、*Sutterella*、*Phascolarctobacterium* 数量恢复,与Control组比较差异无统计学意义(见图3D)。

2.3 抗生素处理对工作记忆的影响 通过基于操作条件反射的DMTP检测Control组和AT组大鼠的认知行为。结果显示,随着延迟的增加,Control组和AT组大鼠的正确压杆率均减少。Control组大鼠在0 s、2 s、4 s、8 s、12 s、18 s、24 s延迟的正确压杆率

分别为100.0%、99.5%、98.8%、93.0%、88.3%、81.5%、80.8%;AT组大鼠在0 s、2 s、4 s、8 s、12 s、18 s、24 s延迟的正确压杆率分别为98.8%、99.0%、96.0%、91.2%、83.7%、83.0%、77.3%。在各延迟,两组大鼠的正确压杆率比较差异无统计学意义($F=3.029, P=0.112$,见图4)。

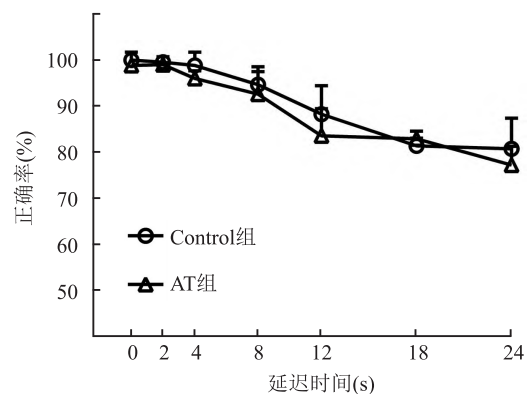


图4 利用DMTP检测Control组和AT组大鼠的工作记忆

2.4 抗生素处理对空间记忆的影响 大鼠在探索

Y 迷宫新异臂的次数和时间反映其空间记忆功能。Y 迷宫检测结果显示,两组大鼠探索新异臂的次数和时间比较差异无统计学意义。Control 组大鼠探索新异臂次数占总探索次数的比率为 (0.43 ± 0.01) , AT 组为 (0.46 ± 0.02) , 两组比较差异无统计学意义 ($t = 1.131, P = 0.284$, 见图 5A)。同样, Control 组大鼠探索新异臂的时间占总探索时间的比率为 (0.54 ± 0.03) , AT 组为 (0.56 ± 0.03) , 两组比较差异无统计学意义 ($t = 0.381, P = 0.711$, 见图 5B)。

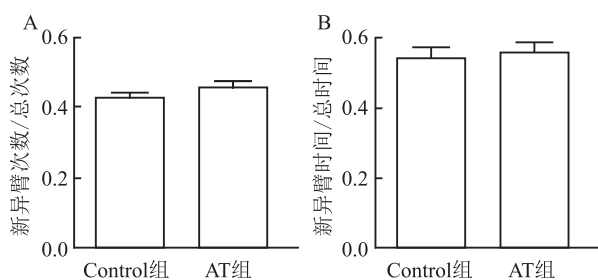


图5 利用Y 迷宫检测 Control 组和 AT 组大鼠的空间记忆
A:探索新异臂的次数的比率;B:探索新异臂的时间的比率

3 讨论

健康成年人的肠道菌群有两个主要门:拟杆菌门和厚壁菌门,占 0.90 以上;其次为放线菌门、变形菌门、梭杆菌门和疣微菌门^[5]。肠道菌群为人类的“第 2 基因组”,从出生开始定植于人体肠道^[6]。微生物与宿主互利共生,在营养代谢、维持肠黏膜屏障功能和免疫调节中起着重要作用^[7-8]。

肠道菌群在调控大脑功能及行为中发挥重要作用,因此提出了“微生物-肠-脑轴”的概念^[9-10]。抗生素处理影响正常肠道菌群的数量和结构,引起菌群失调。研究^[3]表明,氨苄青霉素处理的小鼠厚壁菌门数量减少,引起小鼠 Morris 水迷宫空间记忆和新物体识别记忆缺陷。万古霉素和氨苄青霉素处理短暂性前脑缺血小鼠会增加变形菌门的数量,加重其在 Y 迷宫、新物体识别和巴恩斯迷宫任务中的认知功能损害^[11]。另一项研究^[2]用氨苄青霉素、杆菌肽、美罗培南、新霉素和万古霉素 5 种抗生素组合处理的小鼠肠道菌群数量减少和细菌多样性下降,引起小鼠新物体识别记忆受损。这些研究表明一种抗生素或抗生素组合短期处理可能破坏肠道菌群而影响认知功能,但是停用抗生素后肠道菌群是否会恢复以及对认知行为是否有长期影响并未见报道。

本研究应用氨苄青霉素、万古霉素、甲硝唑和亚胺培南 4 种抗生素联合处理,观察到抗生素抑制大鼠肠道菌群,引起肠道菌群多样性减少,优势菌拟杆菌门和厚壁菌门数量均减少。与之前的研究^[2]结果一致,氨苄青霉素、万古霉素、甲硝唑和亚胺培南组合可以非选择性的去除肠道微生物,引起优势菌的普遍下调。因此,本研究进一步证实短期使用抗生素处理是一种有效的模型,可以探索微生物群及其依赖性脑功能和行为变化的因果关系。除了抗生素处理,无菌 (germ free, GF) 动物也是研究肠道菌群的一个有利工具^[12]。因为 GF 动物不含有任何菌群,可以单独引入某一菌株来观察其对宿主健康的作用,或通过移植患者 (或疾病模型动物) 的粪便微生物来观察肠道菌群对疾病发生发展的影响。但是 GF 动物表现为永久性神经发育和认知行为缺陷^[13],因此当前 GF 动物的相关研究仍有一些值得改进的地方。与 GF 动物研究比较,本研究证实广谱抗生素的短期应用并不会对认知行为造成长期影响。本研究结果进一步支持,通过广谱抗生素处理抑制宿主肠道菌群,然后移植患者或疾病模型动物的粪便微生物来观察其对认知功能的作用是一种更为理想的模型。

参考文献

- [1] Lu Z H, Liu Y W, Ji Z H, et al. Alterations in the intestinal microbiome and mental health status of workers in an underground tunnel environment[J]. BMC Microbiol, 2021, 21(1): 7.
- [2] Fröhlich E E, Farzi A, Mayerhofer R, et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: analysis of gut microbiota-brain communication[J]. Brain Behav Immun, 2016, 56: 140-55.
- [3] Sarkar S R, Mazumder P M, Chatterjee K, et al. Saccharomyces boulardii ameliorates gut dysbiosis associated cognitive decline [J]. Physiol Behav, 2021, 236: 113411.
- [4] 李 丽, 张 昕, 邹 琳. 基于基因组学与代谢组学分析肠道菌群及其代谢物改变与心力衰竭发生的相关性[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(3): 407-12.
- [5] Zhang B, Wang X, Xia R, et al. Gut microbiota in coronary artery disease: a friend or foe? [J]. Biosci Rep, 2020, 40(5): BSR20200454.
- [6] Korpela K, Salonen A, Vepsäläinen O, et al. Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic-treated and in caesarean-born infants[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 182.
- [7] Jandhyala S M, Talukdar R, Subramanyam C, et al. Role of the normal gut microbiota[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(29): 8787-803.
- [8] Li X, He C, Li N, et al. The interplay between the gut microbiota and NLRP3 activation affects the severity of acute pancreatitis in

- mice[J]. Gut Microbes, 2020, 11(6): 1774–89.
- [9] De La Fuente-Nunez C, Meneguetti B T, Franco O L, et al. Neuro-microbiology: how microbes influence the brain[J]. ACS Chem Neurosci, 2018, 9(2): 141–50.
- [10] Powell N, Walker M M, Talley N J. The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut-brain communications[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(3): 143–59.
- [11] Lee K E, Kim J K, Kim D H. Orally administered antibiotics vancomycin and ampicillin cause cognitive impairment with gut dysbiosis in mice with transient global forebrain ischemia[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 564271.
- [12] Ferguson J F, Aden L A, Barbaro N R, et al. High dietary salt-induced dendritic cell activation underlies microbial dysbiosis-associated hypertension[J]. JCI Insight, 2019, 5(13): e126241.
- [13] Dinan T G, Cryan J F, Stanton C. Gut microbes and brain development have black box connectivity[J]. Biol Psychiatry, 2018, 83(2): 97–9.

Effect of antibiotics on gut microbiota and cognitive behaviors in rats

Li Yanli¹, Yang Xiaorong², Zhang Ce², Guo Junhong¹

(¹Dept of Neurology, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001; ²Dept of Physiology, Key Laboratory of Cellular Physiology, Ministry of Education, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

Abstract Objective To investigate the changes and recovery of gut microbiota in rats after broad-spectrum antibiotic exposure and its effect on cognitive behaviors. **Methods** Rats were randomly divided into antibiotic (AT) group and control group. AT group was treated with antibiotic cocktail containing ampicillin, ancomycin, metronidazole and imipenem for 3 days, and control group was gavaged with the same amount of normal saline. On the 4th day (24 h after the last antibiotic treatment) and 2 months, feces were collected for 16S rRNA gene sequencing to detect the changes of gut microbiota; At 2 months, the cognitive behaviors were detected by operant-based delayed matching to position (DMTP) task and Y maze. **Results** On day 4, the gut microbiota in AT group decreased, including a decrease in microbiota diversity ($P < 0.0001$), a reduction of *Bacteroidetes* ($P < 0.0001$) and *Firmicutes* ($P = 0.0001$), and an increase of *Proteobacteria* ($P < 0.0001$). After discontinuation of antibiotics, the microbiota began to recover, which had no difference from control group at 2 months. And there was no significant difference in cognitive behaviors between AT group and control group. **Conclusion** The broad-spectrum antibiotics can decrease gut microbiota in rats. However, this decrease is temporary. The microbiota returns to normal at 2 months after discontinuation of antibiotics. And it does not affect the cognitive behaviors of rats.

Key words antibiotics; gut microbiota; cognitive behaviors; DMTP; Y maze

(上接第 1446 页)

assay was performed to detect cell proliferation while a Senescence β -Galactosidase Staining Kit was used to detect senescent cells, and Western blot was used to detect the changes of p53 and p21. The reverse experiment was carried out with p53 overexpression plasmid. **Results** Cell senescence evoked by doxorubicin could down-regulate the protein expression of SETDB1. After low expression of SETDB1, the proliferation ability of colonic cancer cells decreased, and the proportion of senescent cells increased from $(22.00 \pm 4.35)\%$ to $(54.00 \pm 5.56)\%$ and $(53.33 \pm 4.93)\%$ ($P < 0.001$). After overexpression of SETDB1, the proliferation ability of colon cancer cells increased, and the ratio of senescent cells decreased from $(43.33 \pm 6.11)\%$ to $(21.33 \pm 3.51)\%$ ($P < 0.01$). Through GSE56496 enrichment and analysis, it was found that SETDB1 was related to p53 signal pathway, silencing SETDB1 could increase the levels of p53 and p21 protein, while overexpression of SETDB1 could decrease the level of p53 and p21 protein, and overexpression of p53 reversed the decrease of cell senescence caused by overexpression of SETDB1. **Conclusion** SETDB1 inhibits the senescence of colon cancer cells by inhibiting p53/p21 signal pathway, which provides a potential target for individualized tumor therapy.

Key words colon cancer; SETDB1; cell proliferation; cellular senescence; p53