

·生物化学与分子生物学·

DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2023.05.0149

# 高原鼠兔、高原鼢鼠肠道菌群对低压低氧环境下大鼠海马组织 A $\beta$ 、Tau 及 BDNF 蛋白的影响

黄灵泉<sup>1a</sup>, 李清月<sup>1a</sup>, 冯江鹏<sup>1a</sup>, 陈征<sup>1b</sup>, 姜欣宇<sup>1c</sup>, 王书祥<sup>1b\*</sup>, 靳国恩<sup>1d, 2, 3\*</sup>

(1. 青海大学 a. 医学部 基础医学部; b. 农牧学院; c. 医学部 临床医学院; d. 医学部 高原医学研究中心, 中国青海 西宁 810016; 2. 教育部高原医学重点实验室, 中国青海 西宁 810016; 3. 青海省高原医学应用基础重点实验室, 中国青海 西宁 810016)

**摘要:** 为了探究暴露低压低氧不同时间以及移植高原鼠兔、高原鼢鼠肠道菌群后暴露低压低氧环境是否会影响 SD 大鼠海马组织  $\beta$  淀粉样蛋白(beta-amyloid protein, A $\beta$ )、tau 及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达水平, 首先将 SD 大鼠随机分为常氧组、低压低氧组和低压低氧处理组, 低压低氧组根据暴露低压低氧时间又分为第 1、3、7、15、28 天组, 低压低氧处理组则根据处理因素分为低压低氧对照组、低压低氧+抗生素处理组、低压低氧+抗生素+鼢鼠菌处理组、低压低氧+抗生素+鼠兔菌处理组、低压低氧+抗生素+SD 大鼠菌处理组(10 只/组), 共 11 组; 然后采用尼氏染色观察常氧组和低压低氧组海马组织神经细胞的形态变化, 采用 Western-blot 检测各组 A $\beta$ 、tau 及 BDNF 蛋白表达水平。结果显示, 与常氧组相比, 低压低氧组从第 3 天开始海马组织 CA1 区的神经细胞排列疏松紊乱, 细胞核固缩明显, 并具有时间依赖性; A $\beta$ 、tau 蛋白水平分别从低压低氧暴露第 7 天、3 天开始显著升高, 并随低压低氧暴露时间的延长进一步升高, 其中以 tau 蛋白升高尤为明显; BDNF 蛋白在低压低氧暴露初期显著升高, 而后随低压低氧暴露时间的延长逐渐降低, 与 A $\beta$  和 tau 蛋白水平呈现显著的负相关。此外, 与抗生素处理组相比, 在低压低氧环境下, 移植高原鼠兔肠道菌群的大鼠海马组织中 A $\beta$ 、tau 蛋白的表达显著下降, BDNF 的表达明显升高。实验结果初步表明, 低压低氧可上调大鼠海马组织 A $\beta$ 、tau 蛋白表达, 下调 BDNF 蛋白表达; 肠道菌群移植可上调低压低氧环境下大鼠海马组织 BDNF 蛋白的表达, 同时影响 A $\beta$ 、tau 蛋白的表达, 其中高原鼠兔肠道菌群移植大鼠海马组织中的 A $\beta$ 、tau 蛋白水平被下调, 高原鼢鼠肠道菌群移植大鼠海马组织中的 tau 蛋白水平被上调, A $\beta$  蛋白水平被下调。  
**关键词:** 高原低压低氧; 肠道菌群;  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$ ); tau 蛋白; 脑源性神经营养因子(BDNF)

中图分类号: Q426, R749.1+7

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2024)02-0113-08

## Effects of Intestinal Flora of Plateau Pika and Plateau Zokor on A $\beta$ , Tau and BDNF Proteins in Rat Hippocampus Under Hypobaric Hypoxia

HUANG Lingquan<sup>1a</sup>, LI Qingyue<sup>1a</sup>, FENG Jiangpeng<sup>1a</sup>, CHEN Zheng<sup>1b</sup>,  
JIANG Xinyu<sup>1c</sup>, WANG Shuxiang<sup>1b\*</sup>, JIN Guoen<sup>1d, 2, 3\*</sup>

(1. a. Department of Basic Medicine, Medical College; b. College of Agriculture and Animal Husbandry; c. Department of Clinical Medicine, Medical College; d. Research Center for High Altitude Medicine, Medical College, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China; 2. Key Laboratory of Plateau Medicine of Ministry of Education, Xining 810016, Qinghai, China; 3. Key Laboratory of Basic Application of Plateau Medicine in Qinghai Province, Xining 810016, Qinghai, China)

**Abstract:** In order to explore whether hypobaric hypoxia exposure time and transplantation of plateau pika and plateau zokor intestinal flora will affect the expression of beta-amyloid protein (A $\beta$ ), tau and brain-derived

收稿时间: 2023-05-06; 修回日期: 2023-08-30; 网络首发日期: 2024-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81974283); 国家重点研发计划项目(2022YFC2403705)

作者简介: 黄灵泉(1993—), 女, 广西河池人, 硕士研究生, E-mail: hlqpathology@163.com; \*通信作者: 靳国恩(1967—), 男, 藏族, 青海乐都人, 教授, 主要从事高原低压低氧神经与心血管生理学方面的研究, E-mail: jmey\_2005teacher@aliyun.com.cn; 王书祥(1989—), 男, 青海平安人, 副研究员, 主要从事反刍动物营养与饲料研究, E-mail: 1585094890@163.com。

neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus of the Sprague–Dawley (SD) rats, SD rats were first randomly divided into normoxia group, hypobaric hypoxia group and hypobaric hypoxia treatment group. The rats in the hypobaric hypoxia group were further divided according to the exposure time (1, 3, 7, 15, and 28 days) to hypobaric hypoxia, while those in the hypobaric hypoxia treatment group were further divided according to the treatment factors: hypobaric hypoxia (as a control), hypobaric hypoxia + antibiotic treatment, hypobaric hypoxia + antibiotic + zokor fungus treatment, hypobaric hypoxia + antibiotic + pika fungus treatment, hypobaric hypoxia + antibiotic + SD rat fungus treatment. Therefore, there were totally 11 groups, each having 10 rats. The morphological changes of hippocampal neurons in normoxia group and hypobaric hypoxia group were observed by Nissl staining. The expression levels of  $A\beta$ , tau and BDNF proteins in each group were detected by Western–blot. The results showed that, compared with the normoxia group, the hypobaric hypoxia group had loosely arranged and disordered neurons in the hippocampal CA1 area from the third day, with obvious nuclear condensation appearing in a time–dependent manner. The levels of  $A\beta$  and tau proteins were significantly increased from the 7th and 3rd days, respectively, of hypobaric hypoxia exposure, and further increased with the time of exposure, especially the level of tau protein. The BDNF protein level increased significantly in the early stage of hypobaric hypoxia exposure, and then decreased gradually with the exposure time, showing a significantly negative correlation with the  $A\beta$  and tau protein levels. In addition, compared with rats in antibiotic treatment group, rats transplanted with intestinal flora of plateau pika had significantly decreased expression of  $A\beta$  and tau proteins and significantly increased expression of BDNF in the hippocampus under hypobaric hypoxia. The results revealed that hypobaric hypoxia could up–regulate the expression of  $A\beta$  and tau proteins and down–regulate the expression of BDNF protein in hippocampus of rats, and that intestinal flora transplantation could up–regulate the expression of BDNF protein in hippocampus of rats in a hypobaric hypoxic environment and also affect the expression of  $A\beta$  and tau protein. Transplantation with plateau pika intestinal flora down–regulated the levels of  $A\beta$  and tau proteins, while transplantation with plateau zokor intestinal flora up–regulated the level of tau protein and down–regulated the  $A\beta$  protein.

**Key words:** plateau hypobaric hypoxia; gut microbiota; beta–amyloid protein ( $A\beta$ ); tau protein; brain–derived neurotrophic factor (BDNF)

(*Life Science Research*, 2024, 28(2): 113–120)

对于进入高原地区的人而言, 无论暴露于急性低压低氧还是慢性低压低氧, 全身各组织、器官均会受到不同程度的损伤, 其中以中枢神经系统的损伤较为严重, 这与神经细胞对氧的需求量大有关。由于大脑对缺氧十分敏感, 中枢神经细胞抗低氧损伤的能力也很弱, 低压低氧暴露下机体很容易发生注意力、记忆力、复杂思维判断力和思维活性下降等认知功能障碍<sup>[1]</sup>。慢性低压低氧下人认知功能损伤呈现渐进性和隐匿性特点, 其损伤也就显得更加严重<sup>[2]</sup>。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又称老年性痴呆, 是发生在老年前期与老年期的一种神经退行性脑病, 其发病率随着年龄增长而显著增加。AD的主要临床表现为认知功能和记忆功能逐渐丧失, 其发病具有隐匿性、渐进性和致死性, 其显著的病理特征为 $\beta$ 淀粉样蛋白(beta–amyloid

protein,  $A\beta$ )沉积、过度磷酸化 tau 蛋白的神经原纤维缠结等<sup>[3]</sup>。有研究表明, 低压低氧环境会促进  $A\beta$  的聚积和 tau 蛋白过度磷酸化, 从而加剧神经退行性改变<sup>[4]</sup>, 并且  $A\beta$  的聚积可以促进 tau 蛋白的过度磷酸化, 从而触发神经毒性, 导致学习记忆的功能损伤<sup>[5]</sup>。脑源性神经营养因子(brain–derived neurotrophic factor, BDNF)是一种神经营养因子, 在维护神经细胞正常功能中发挥着重要的作用。有研究表明, 在 AD 患者体内, BDNF 的 mRNA 及蛋白质表达显著降低<sup>[6]</sup>, 并且随着 AD 病情程度加重进一步降低<sup>[7]</sup>。Boots 等<sup>[8]</sup>分析了威斯康星州(Wisconsin) 1 023 名成人的 BDNF 基因分型, 并对他们进行了认知评估, 发现 BDNF 基因 Val66–Met 携带者在语言学习、记忆以及速度和灵活性方面明显差于 BDNF Val/Val 纯合子人群, 并且  $A\beta$  的聚积可以加剧 BDNF 基因 Val66Met 携带者认

知水平的下降, 这些事实表明 BDNF 的水平在 AD 的发病机制中起重要作用。而低压低氧可抑制 BDNF 蛋白的表达, 并伴随海马细胞的严重损伤<sup>[9]</sup>, 这可能与 A $\beta$  通过 Ash11 蛋白调节 BDNF 启动子区的 H3K4Me2 水平从而抑制 BDNF 的表达, 最终促进神经元的死亡有关<sup>[10]</sup>。另有研究报道, BDNF 可以通过增强淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的  $\alpha$ -分泌酶水平减少 A $\beta$  的产生<sup>[11]</sup>, 也可通过酪氨酸激酶 B (tyrosine kinase B, TrkB) 和磷脂酰肌醇 3 激酶/糖原合成酶激酶 3 $\beta$ /蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/glycogen synthase kinase 3 $\beta$ /protein kinase B, PI3K/GSK3 $\beta$ /Akt) 信号通路抑制 tau 蛋白磷酸化, 从而改善 AD 模型大鼠认知功能障碍<sup>[12-13]</sup>。因此我们认为, BDNF 与 A $\beta$ 、tau 密切相关, 并在一定程度上影响 AD 的认知水平。

肠道和大脑通过微生物-肠-脑轴进行信息交流。Liu 等<sup>[14]</sup>研究发现, 肠道菌群稳态对于维持肠道健康以及调节血脑屏障通透性、脑能量稳态和突触传递至关重要, 是机体调节认知功能障碍的一种新机制。有研究表明, 肠道菌群的失调可能会导致包括 AD 在内的神经精神疾病<sup>[15]</sup>, 肠道内微生物多样性异常减少的人群更容易发生 AD<sup>[16]</sup>。相关动物研究也发现, 通过移植健康小鼠粪菌至 AD 小鼠体内重建肠道菌群动态平衡, 可减轻脑内 A $\beta$  和 tau 蛋白的病理改变, 从而改善认知功能障碍<sup>[17]</sup>。以上研究提示, 肠道菌群的干预可能有助于改善低压低氧下机体认知功能受损的情况。

高原鼠兔和高原鼢鼠是青藏高原的两种优势小型哺乳动物, 其肠道微生物在宿主高原适应性方面发挥着重要作用<sup>[18]</sup>。为了探明肠道菌群能否改变暴露低压低氧环境下 SD 大鼠海马组织 A $\beta$ 、tau 及 BDNF 蛋白的表达水平, 本实验对暴露低压低氧不同时间及移植高原鼠兔、高原鼢鼠肠道菌群后大鼠海马组织中的 A $\beta$ 、tau 及 BDNF 蛋白的变化特点进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器及试剂

低压氧舱实验室(DYC-3000, 贵州风雷氧舱有限责任公司), Western-blot 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), AI600 化学发光仪(美国 GE 公司); BCA 蛋白质定量测定试剂盒、凝胶提取试剂盒、蛋白质预染标记(美国 ThermoFisher Scientific 公司), 甲硝唑

(万邦德制药集团股份有限公司), 万古霉素(浙江医药股份有限公司新昌制药厂), 新霉素(西安利君制药有限公司), 氨苄青霉素(浙江国镜药业有限公司); A $\beta$  蛋白抗体(商品号 ab32136, 美国 Amresco 公司), tau 蛋白抗体(商品号 ab76128, 美国 Abcam 公司), BDNF 蛋白抗体(商品号 BST17304113, 美国博士德生物公司), FITC 标记山羊抗兔 IgG (H+L) (商品号 A0208, 碧云天生物科技有限公司)。

### 1.2 动物与分组

三周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 SD 大鼠, 雄性, 体重(50 $\pm$ 3) g, 110 只, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司; 成年高原鼠兔, 雄性, 5 只, 源于青海省湟源县(3 000~3 200 m); 成年高原鼢鼠, 雄性, 5 只, 源于青海省湟源县(3 000~3 200 m)。动物实验经过青海大学动物保护伦理委员会批准(审批编号: PJ-202301-21)。

110 只 SD 大鼠根据体重按随机数字表法分为常氧组(N, 10 只)、低压低氧组(50 只)和低压低氧处理组(50 只)。其中, 低压低氧组根据低压低氧暴露时间又分为低压低氧第 1、3、7、15、28 天(H1、H3、H7、H15、H28)共 5 组(10 只/组); 低压低氧处理组根据处理因素分为 5 组: 低压低氧对照组(HC)、低压低氧+抗生素处理组(H-Anti)、低压低氧+抗生素+鼢鼠菌处理组(H-Anti-M)、低压低氧+抗生素+鼠兔菌处理组(H-Anti-O)、低压低氧+抗生素+SD 大鼠菌处理组(H-Anti-I), 每组 10 只。

### 1.3 低压低氧处理

将大鼠置于低压氧舱内, 模拟海拔为 6 000 m, 舱内温度为(22 $\pm$ 2)  $^{\circ}$ C, 湿度为 50%~60%, 低压低氧期间大鼠自由取食。

### 1.4 溶液的配制

抗生素混合溶液的配制: 使用无菌纯水溶解抗生素, 甲硝唑、万古霉素、新霉素和氨苄青霉素对应的质量浓度分别为 1 g/L、500 mg/L、1 g/L 和 1 g/L, 充分混匀后置于 4  $^{\circ}$ C 贮存备用。

肠道菌群混悬液的配制: 从实验预饲期开始, 用原日常草料饲养高原鼠兔、高原鼢鼠、SD 大鼠各 5 只, 动物自由采食饮水。每天收取新鲜粪便, 将 1 g 粪便溶解于 10 mL 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)中, 振荡至彻底均质化后使用纱布过滤 3 次, 得到棕色的菌群混悬液, -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

### 1.5 动物模型及组织制备

将低压低氧组 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组

(每组 10 只)置于低压氧舱内,进舱后第 1、3、7、15、28 天分别进行样本采集:腹腔注射 10%乌拉坦(山东齐鲁兴华制药有限公司)(3.5 mL/kg)麻醉大鼠,断头剥取大脑后分离双侧海马组织,左侧海马组织置于多聚甲醛溶液中,右侧海马组织置于冻存管中,−80 °C 冰箱保存备用。

低压低氧处理组中,40 只 SD 大鼠每天水饲 200  $\mu$ L 抗生素混合溶液 1 次,连续 7 d;HC 组饲喂纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。抗生素停药 24 h 后,H-Anti-M 组、H-Anti-O 组、H-Anti-I 组分别移植鼯鼠、鼠兔、SD 大鼠肠道菌群,每次 200  $\mu$ L,每日 1 次,连续灌胃 7 d;H-Anti 组和 HC 组不移植菌群,每日灌胃 200  $\mu$ L PBS 缓冲液 1 次,连续灌胃 7 d。随后,将低压低氧处理组 50 只 SD 大鼠全部转移至低压氧舱内,实验人员每天入舱 1 次,更换水料、打扫卫生、收集信息、观察大鼠生长状况等;饲喂 28 d 后用 10%乌拉坦(3.5 mL/kg)麻醉大鼠,采取断头法处死大鼠后取其海马组织。

### 1.6 尼氏染色

将 4%多聚甲醛固定的海马组织切成 25  $\mu$ m 薄片,贴于载玻片上,自然晾干;切片依次浸过氯仿和 95%、80%、75%的乙醇,随后在质量分数为 1%的焦油紫中染色 10 min (37 °C);用超纯水洗涤 3 次后,依次过 75%、80%、95%的乙醇,而后在氯仿中分色 15 s~5 min;用无水乙醇 I、II 依次脱水 10 min 后,再于二甲苯 I、II 中依次透明 15 min;用中性树胶固封。将切片置于 400 倍显微镜下,观察各组大鼠海马 CA1 区神经细胞的结构在低压低氧环境下的变化。

### 1.7 免疫印迹分析

采用 RIPA 裂解液(碧云天生物科技有限公司)裂解细胞,获取裂解物后用 BCA 蛋白质定量测定试剂盒测量蛋白质浓度。采用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶对 40  $\mu$ g 蛋白质进行电泳。将电泳产物转移至聚偏氟乙烯[poly(vinylidene fluoride), PVDF]膜上,转膜 120 min 后,用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h;分别加入  $A\beta$  (1 : 20 000)、tau (1 : 10 000)、BDNF (1 : 2 000)的一抗,4 °C 过夜;洗膜,加入二抗稀释液(1 : 10 000)孵育 1 h;洗膜,最后用 ECL (enhanced chemiluminescence)发光液曝光。采用 Image J 软件分析蛋白质表达水平。用  $\beta$ -actin 或 GAPDH 作为内参来表示各组中  $A\beta$ 、tau 和 BDNF 的相对表达量。

## 1.8 统计分析

数据采用 SPSS 26.0 统计软件进行处理,计量资料用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,蛋白质表达的相关性分析采用计算连续性变量的 Pearson 相关分析方法。

## 2 结果

### 2.1 低压低氧暴露不同时间对海马形态的影响

为了解低压低氧对大鼠海马组织形态的影响,将大鼠置于模拟高原低压低氧环境的低压氧舱内,在低压低氧第 1、3、7、15、28 天分别取海马组织,采用尼氏染色观察海马 CA1 区神经细胞的结构、数量变化。结果显示:常氧组海马 CA1 区的神经细胞形态规则,呈圆形或椭圆形,且排列整齐,核仁清晰(图中箭头所示)(图 1A)。低压低氧暴露第 1 天时,海马 CA1 区神经细胞的形态、数量及排列方式均未见明显异常改变;从第 3 天开始,神经细胞排列稍紊乱;到第 7 天时,仅少许神经细胞核仁可见;第 15 天时,神经细胞排列紊乱,间质疏松,细胞核固缩深染;第 28 天时,神经细胞的形态皱缩拉长,数量明显减少,间质疏松更为明显(图 1B~F)。

### 2.2 低压低氧暴露不同时间对海马 $A\beta$ 、tau 和 BDNF 蛋白表达的影响

为进一步研究低压低氧暴露不同时间对大鼠海马组织  $A\beta$ 、tau 及 BDNF 蛋白表达的影响,采用 Western-blot 检测了各组大鼠海马组织的  $A\beta$ 、tau 及 BDNF 蛋白。结果显示:与常氧组相比,低压低氧组大鼠海马组织  $A\beta$  蛋白的表达水平从低压低氧第 7 天开始逐渐升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ )(图 2A~B),但随着低压低氧暴露时间的延长,其升高的幅度相对缓慢;tau 蛋白的表达水平从低压低氧第 3 天开始显著升高( $P<0.01$ ),并随着低压低氧暴露时间的延长,升高幅度逐渐增加(图 2A、C);BDNF 蛋白的表达水平于低压低氧暴露初期显著上升( $P<0.01$ ),但于低压低氧第 3 天以后逐渐降低,并在低压低氧第 7 天显著低于常氧组( $P<0.01$ ),而后随着低压低氧暴露时间的延长维持在较低水平(图 2A、D)。综上可知,低压低氧环境可以导致 SD 大鼠海马组织中  $A\beta$  和 tau 蛋白的水平升高,而 BDNF 蛋白的水平在短暂升高后随着低压低氧暴露时间的延长逐渐降低。进一步对  $A\beta$ 、tau 蛋白与 BDNF 蛋白的表达关联性展开分析,结果显示:BDNF 蛋白的表达水平与  $A\beta$  蛋白( $R^2=0.73$ , $P<0.05$ )、

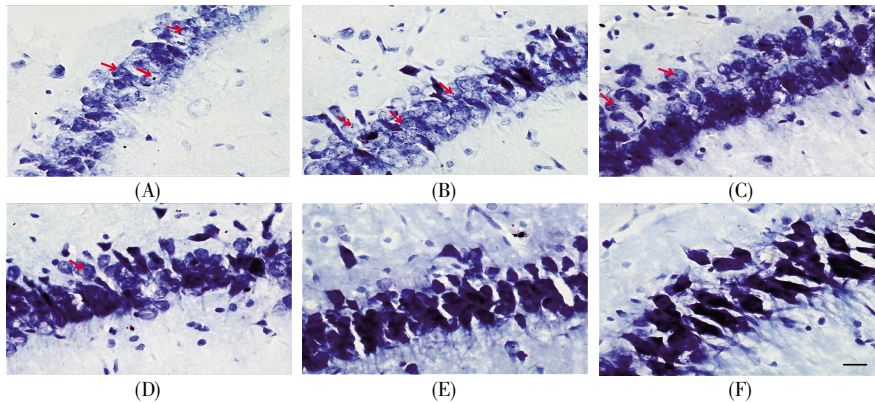


图 1 低压低氧对海马形态影响的尼氏染色图(标尺: 20  $\mu$ m)  
(A) 常氧组(N); (B) 低压低氧第 1 天(H1); (C) 低压低氧第 3 天(H3); (D) 低压低氧第 7 天(H7); (E) 低压低氧第 15 天(H15); (F) 低压低氧第 28 天(H28)。箭头所指为核仁清晰的神经细胞。

**Fig.1 Effects of hypobaric hypoxia on hippocampal morphology detected by Nissl staining** (scale bar: 20  $\mu$ m)  
(A) Normoxic group (N); (B) Hypobaric hypoxia day 1 (H1); (C) Hypobaric hypoxia day 3 (H3); (D) Hypobaric hypoxia day 7 (H7); (E) Hypobaric hypoxia day 15 (H15); (F) Hypobaric hypoxia day 28 (H28). Arrows show the nerve cells with the clear nucleolus.

tau 蛋白( $R^2=0.62$ ,  $P<0.05$ )的表达水平均存在显著负相关(图 3)。

### 2.3 菌群移植对低压低氧大鼠海马组织 A $\beta$ 、tau 及 BDNF 蛋白表达的影响

为进一步研究抗生素处理后不同菌群移植对

低压低氧暴露 28 d 大鼠海马组织中 A $\beta$ 、tau 及 BDNF 蛋白表达的影响, 采用 Western-blot 检测了各菌群处理组大鼠海马组织的 A $\beta$ 、tau 及 BDNF 蛋白。结果显示: 与 HC 组相比, H-Anti-H-Anti-O、H-Anti-I 组大鼠海马的 A $\beta$  水平均显著

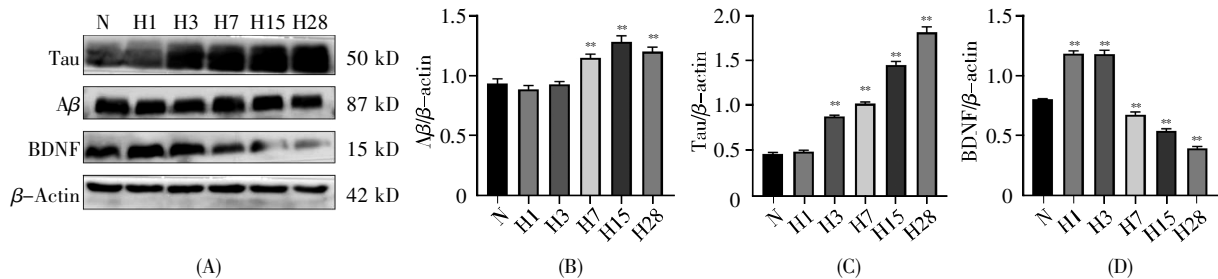


图 2 Western-blot 检测低压低氧暴露不同时间下海马组织中 A $\beta$ 、tau 及 BDNF 的表达  
(A) Western-blot 条带图; (B) A $\beta$  蛋白的表达分析; (C) Tau 蛋白的表达分析; (D) BDNF 蛋白的表达分析。\*:  $P<0.01$  vs.常氧组(N)。  
**Fig.2 Western-blot detection of the expression of A $\beta$ , tau and BDNF proteins in hippocampus at different time points of hypobaric hypoxia exposure**

(A) Images of Western-blot bands; (B) Expression analysis of A $\beta$  protein; (C) Expression analysis of tau protein; (D) Expression analysis of BDNF protein. \*\*:  $P<0.01$  vs. normoxic group (N).

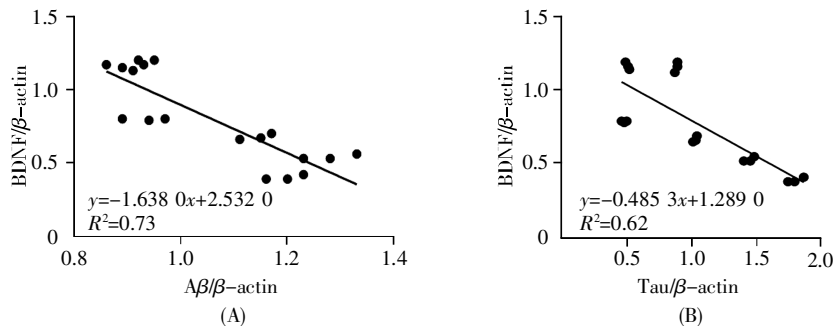


图 3 低压低氧暴露不同时间下 BDNF 蛋白与 A $\beta$ 、tau 蛋白表达的相关性分析  
(A) BDNF 与 A $\beta$  的相关性分析; (B) BDNF 与 tau 的相关性分析。

**Fig.3 Correlation analysis of BDNF and A $\beta$  and tau expression at different time points of hypobaric hypoxia exposure**  
(A) Correlation analysis of BDNF and A $\beta$  expression; (B) Correlation analysis of BDNF and tau expression.

升高( $P<0.01$ ) (图 4A~B); H-Anti-O 组的 tau 蛋白水平显著降低( $P<0.01$ ), 其余 3 组的 tau 蛋白水平均显著升高( $P<0.01$ ) (图 4A、C); H-Anti、H-Anti-M、H-Anti-I 组大鼠海马中的 BDNF 蛋白水平均显著下降( $P<0.01$ ), 而 H-Anti-O 组大鼠海马的 BDNF 蛋白水平显著升高( $P<0.01$ ) (图 4A、D)。与 H-Anti 组相比, 菌群移植组大鼠海马的  $A\beta$  水平均显著下降( $P<0.01$ ) (图 4A~B), BDNF 水平均显著升高( $P<0.01$ ) (图 4A、D); 此外, H-Anti-O 组大鼠海马的 tau 蛋白水平显著下降( $P<0.01$ ), 而 H-Anti-I 和 H-Anti-M 组的 tau 蛋白水平显著增加( $P<0.01$ ) (图 4A、C)。综上可知, 在仅抗生素处理的情况下, 低压低氧暴露 28 d 时大鼠海马的  $A\beta$  和 tau 蛋白表达升高, BDNF 蛋白表达降低; 在进行菌群移植处理后, 低压低氧暴露大鼠海马的  $A\beta$  蛋白表达均降低, BDNF 蛋白表达均升高, 但 tau 蛋白仅在 H-Anti-

O 组表达降低, 在 H-Anti-I 和 H-Anti-M 组的表达反而显著升高。进一步对在抗生素和菌群移植处理后低压低氧暴露 28 d 的大鼠海马 BDNF 蛋白与  $A\beta$ 、tau 蛋白的表达相关性展开分析, 图 5 的结果显示: BDNF 蛋白与  $A\beta$  蛋白存在一定的表达负相关, 但相关性不显著( $R^2=0.186$ ,  $P>0.05$ ), 但与 tau 蛋白存在显著的表达负相关( $R^2=0.494$ ,  $P<0.05$ )。

### 3 讨论

当机体进入高原环境时, 长期低压低氧会破坏脑细胞的内环境, 从而促进氧化应激、炎症、凋亡、线粒体代谢紊乱等病理生理活动, 继而使机体出现认知功能障碍<sup>[9]</sup>。本研究结果显示, 低压低氧会导致海马 CA1 区神经细胞排列疏松紊乱, 细胞核固缩, 甚至细胞的溶解, 这种损伤随暴露低压低氧时间的延长而加剧(图 1); 同时也伴随着  $A\beta$ 、

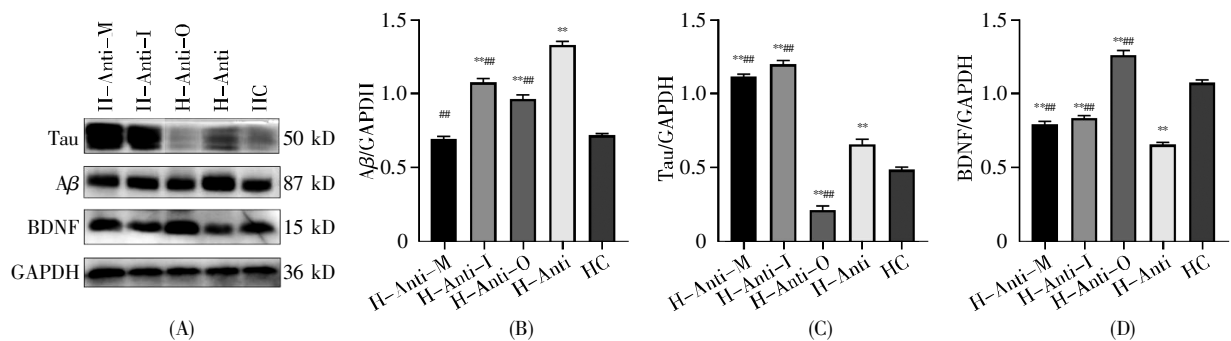


图 4 Western-blot 检测菌群移植后低压低氧暴露 28 d 时大鼠海马组织中  $A\beta$ 、tau 及 BDNF 的表达

(A) Western-blot 条带图; (B)  $A\beta$  蛋白在不同处理组中的表达分析; (C) Tau 蛋白在不同处理组中的表达分析; (D) BDNF 蛋白在不同处理组中的表达分析。\*:  $P<0.01$  vs. 低压低氧对照组(HC 组); #:  $P<0.01$  vs. 低压低氧+抗生素处理组(H-Anti 组)。

Fig.4 Western-blot detection of the expression of  $A\beta$ , tau and BDNF in hippocampus of rats exposed to hypobaric hypoxia for 28 days after microbiota transplantation

(A) Images of Western-blot bands; (B) Expression analysis of  $A\beta$  protein in different treatment groups; (C) Expression analysis of tau protein in different treatment groups; (D) Expression analysis of BDNF protein in different treatment groups. \*:  $P<0.01$  vs. hypobaric hypoxia control group (HC); #:  $P<0.01$  vs. hypobaric hypoxia + antibiotic treatment group (H-Anti group).

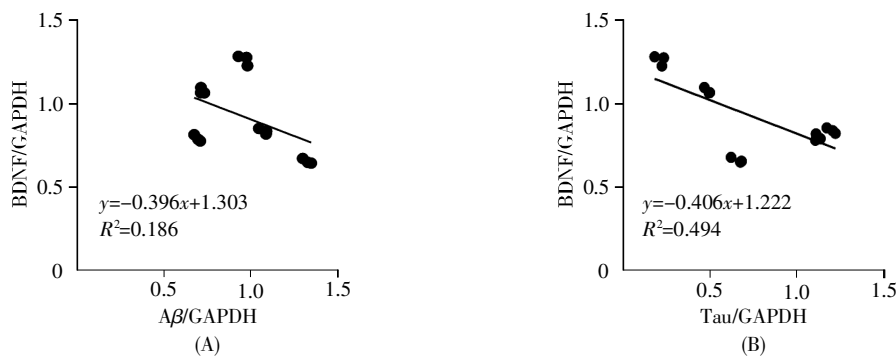


图 5 菌群移植后低压低氧暴露 28 d 时大鼠海马 BDNF 与  $A\beta$ 、tau 表达的相关性分析

(A) BDNF 与  $A\beta$  的相关性分析; (B) BDNF 与 tau 的相关性分析。

Fig.5 Correlation analysis of BDNF and  $A\beta$  and tau expression in hippocampus of rats exposed to hypobaric hypoxia for 28 days after microbiota transplantation

(A) Correlation analysis of BDNF and  $A\beta$  expression; (B) Correlation analysis of BDNF and tau expression.

tau 蛋白表达水平的上调和 BDNF 蛋白表达水平的下调,且这些变化均具有时间依赖性,其中 tau 蛋白水平的变化幅度明显大于 A $\beta$  蛋白(图 2)。低压低氧上调 A $\beta$ 、tau 蛋白表达水平的结果与 Li 等<sup>[20]</sup>、Gao 等<sup>[21]</sup>的研究报道基本一致。而 BDNF 与 A $\beta$ 、tau 的表达水平呈现显著的负相关(图 3),提示 BDNF 蛋白表达水平的变化可能受到 A $\beta$ 、tau 蛋白表达水平的影响,这或许是大鼠海马细胞损伤的原因之一。有研究证实,缺氧通过低氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1 $\alpha$ )的活化抑制 BDNF 的表达,引起神经可塑性受损,加剧认知功能损害<sup>[22]</sup>;可溶性野生型 tau 蛋白在体内外显著下调 BDNF 转录,敲除 tau 基因可部分解除 A $\beta$  蛋白对 BDNF 蛋白的抑制<sup>[23]</sup>。另有研究发现,升高小鼠神经-2a 细胞中 BDNF 的水平可降低 A $\beta$  沉积,从而改善小鼠的认知能力<sup>[24]</sup>。因此,本文的研究结果提示, A $\beta$ 、tau 蛋白通过抑制 BDNF 蛋白表达水平参与了低压低氧下大鼠海马细胞的损伤过程。

近年来,大量研究报道肠道菌群可影响神经的功能活动<sup>[25-27]</sup>。本研究结果显示:与低压低氧对照组(无抗生素和肠道菌群干预)相比,抗生素处理后 SD 大鼠在低压低氧环境下 A $\beta$  蛋白和 tau 蛋白的水平进一步显著增加,而 BDNF 蛋白的水平显著下降(图 4),表明由于缺乏正常肠道菌群,低压低氧环境中的大鼠更容易堆积 A $\beta$  蛋白和 tau 蛋白。这与已有研究报道的使用抗生素氨基青霉素可对大鼠的空间记忆造成损伤<sup>[28]</sup>的结果相一致,提示肠道菌群的确能够改变脑神经组织的某些蛋白质表达,其可能通过微生物-肠-脑轴对神经递质合成、释放等产生影响<sup>[29-31]</sup>。面对高原环境,机体通常存在低压低氧损伤和低压低氧适应两种反应状态,而高原土生动物具有很强的低压低氧适应能力。我们的研究发现,移植不同物种的肠道菌群对脑组织的影响不同,与抗生素处理组相比,移植高原鼠兔肠道菌群的大鼠海马组织中 A $\beta$  和 tau 蛋白的表达水平明显降低(图 4A~C),而 BDNF 表达量显著增加(图 4D),tau 与 BDNF 呈现显著负相关(图 5B),表明接受高原鼠兔肠道菌群移植的大鼠可能也具备了与高原鼠兔相似的神经功能活动,即对低压低氧的耐受性增强了。相关性分析结果显示, BDNF 与 A $\beta$  的相关性显著低于与 tau 蛋白的相关性(图 5),意味着 BDNF 蛋白的水平更容易受 tau 蛋白的影响。需要指出的是,移植高原鼢鼠肠道菌群的大鼠海马组织中 tau 蛋白的水平

不仅不降低反而升高,甚至高于低压低氧对照组(图 4A、C)。同为高原土生动物,高原鼠兔和高原鼢鼠肠道菌群的移植结果差别很大,分析原因,可能与两种动物的生活环境和肠道菌群的优势比例不同相关。从环境上比较,两种动物虽然都生活在低压低氧环境,但高原鼢鼠长期生活于地下,对缺氧的耐受性更强,鼢鼠生存环境中的二氧化碳浓度更高,周围微生物分布特点也因环境的不同而有较大区别,加之缺乏光照反应,其在机体代谢、免疫功能等方面均与高原鼠兔存在较大差异,这种差异直接导致两个物种的肠道菌群结构存在较大差异。不同肠道菌群会产生不同的生物学反应,有研究人员对 119 个微生物属进行了 AD 相关性风险评估,发现了 6 种风险菌属,包括拟杆菌门的另枝菌属(*Alistipes*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)、厚壁菌门的毛螺菌属(*Lachnospira*)和韦荣氏球菌属(*Veillonella*)、放线菌门的柯林斯菌属(*Collinsella*)以及假单胞菌门的萨特氏菌属(*Sutterella*)。其中,最显著的风险相关属是拟杆菌属。另外,在 14 种保护菌中,11 种来自厚壁菌门,2 种来自放线菌门,1 种来自拟杆菌门<sup>[27]</sup>。在门水平上,高原鼢鼠肠道拟杆菌门的相对丰度更高,而高原鼠兔肠道厚壁菌门和放线菌门的相对丰度更高;另外,高原鼠兔肠道微生物的  $\alpha$  多样性高于高原鼢鼠<sup>[18]</sup>。

综上所述,本研究表明,低压低氧环境会导致大鼠海马组织 A $\beta$ 、tau 蛋白水平的增加,并且这种增加具有时间依赖性,其中 tau 蛋白水平的升高尤为显著;BDNF 蛋白的水平在初期显著升高,而后随低压低氧暴露时间的延长逐渐降低。另外,肠道菌群移植会影响大鼠海马组织 A $\beta$ 、tau 蛋白的水平,且不同物种来源的肠道菌群对脑组织的影响不同,高原鼠兔肠道菌群可降低低压低氧环境下 tau 蛋白的生成并且有利于 BDNF 的合成,高原鼢鼠的肠道菌群可以促进 BDNF 和 tau 蛋白的合成,但 A $\beta$  蛋白的水平在移植高原鼢鼠的肠道菌群后明显降低,这种差异性结果尚需进一步研究。不过,高原鼠兔肠道菌群移植可下调 tau 蛋白和上调 BDNF 蛋白表达量的结果或许可以为后续抗缺氧研究提供一定的参考。

#### 参考文献(References):

- [1] LI Y, WANG Y. Effects of long-term exposure to high altitude hypoxia on cognitive function and its mechanism: a narrative review[J]. Brain Sciences, 2022, 12(6): 808.

- [2] 靳国恩, 格日力. 高原低氧与脑组织结构和功能损伤[J]. 中国高原医学与生物学杂志(JIN Guoen, GE Rili. High altitude hypoxia and brain tissue structure and function damage[J]. Journal of Chinese High Altitude Medicine and Biology), 2021, 42(3): 185–189.
- [3] WELLER J, BUDSON A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment[J]. F1000Research, 2018, 7(F1000 Faculty Rev): 1161.
- [4] SACCHINI S, DÍAZ-DELGADO J, ESPINOSA DE LOS MONTEROS A, *et al.* Amyloid- $\beta$  peptide and phosphorylated tau in the frontopolar cerebral cortex and in the cerebellum of toothed whales: aging versus hypoxia[J]. Biology Open, 2020, 9(11): bio054734.
- [5] POURHAMZEH M, JOGHATAEI M T, MEHRABI S, *et al.* The interplay of tau protein and  $\beta$ -amyloid: while tauopathy spreads more profoundly than amyloidopathy, both processes are almost equally pathogenic[J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2021, 41(6): 1339–1354.
- [6] NAGATA T, KOBAYASHI N, SHINAGAWA S, *et al.* Plasma BDNF levels are correlated with aggressiveness in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease[J]. Journal of Neural Transmission, 2014, 121(4): 433–441.
- [7] LIM Y Y, LAWS S M, PERIN S, *et al.* BDNF Val66Met polymorphism and memory decline across the spectrum of Alzheimer's disease[J]. Genes, Brain and Behavior, 2021, 20(5): e12724.
- [8] BOOTS E A, SCHULTZ S A, CLARK L R, *et al.* BDNF Val66-Met predicts cognitive decline in the Wisconsin Registry for Alzheimer's Prevention[J]. Neurology, 2017, 88(22): 2098–2106.
- [9] 米国霞, 李晓娜, 傅振幸, 等. 藏药四味黄芪散对低压低氧诱导大鼠海马自噬损伤的保护作用[J]. 中国高原医学与生物学杂志(MI Guoxia, LI Xiaona, FU Zhenxing, *et al.* The protective effect of Tibetan medicine Siwei Huangqi Powder on autophagy injury induced by hypobaric hypoxia in rat hippocampus[J]. Journal of Chinese High Altitude Medicine and Biology), 2019, 40(1): 36–44.
- [10] 刘琪, 徐志伟, 王立群, 等.  $A\beta$  通过 Ash11 上调 H3K4 二甲基化水平抑制 BDNF 表达并介导海马神经元损伤[J]. 医学研究杂志(LIU Qi, XU Zhiwei, WANG Liqun, *et al.* Upregulation of Ash11-dependent H3K4Me2 level to inhibit BDNF expression and mediate hippocampal neuron damage[J]. Journal of Medical Research), 2018, 47(8): 29–33.
- [11] NIGAM S M, XU S H, KRITIKOU J S, *et al.* Exercise and BDNF reduce  $A\beta$  production by enhancing  $\alpha$ -secretase processing of APP[J]. Journal of Neurochemistry, 2017, 142(2): 286–296.
- [12] XU A H, YANG Y, SUN Y X, *et al.* Exogenous brain-derived neurotrophic factor attenuates cognitive impairment induced by okadaic acid in a rat model of Alzheimer's disease[J]. Neural Regeneration Research, 2018, 13(12): 2173–2181.
- [13] 王欣波, 赵宇. 安神定志方对阿尔茨海默病大鼠 tau 蛋白磷酸化及 BDNF/TrkB 信号通路的影响[J]. 海南医学院学报(WANG Xinbo, ZHAO Yu. The effect of AnshenDingzhi Fang on tau protein phosphorylation and BDNF/TrkB signaling pathway in Alzheimer's disease rats[J]. Journal of Hainan Medical University), 2019, 25(21): 1612–1616.
- [14] LIU Z G, DAI X S, ZHANG H B, *et al.* Gut microbiota mediates intermittent-fasting alleviation of diabetes-induced cognitive impairment[J]. Nature Communications, 2020, 11: 855.
- [15] COX L M, WEINER H L. Microbiota signaling pathways that influence neurologic disease[J]. Neurotherapeutics, 2018, 15(1): 135–145.
- [16] BOSTANCIKLIÖÇLU M. The role of gut microbiota in pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(4): 954–967.
- [17] KIM M S, KIM Y, CHOI H, *et al.* Transfer of a healthy microbiota reduces amyloid and tau pathology in an Alzheimer's disease animal model[J]. Gut, 2020, 69(2): 283–294.
- [18] 冯天舒, 俞巧玲, 周蕊, 等. 高原鼠兔和高原鼯鼠肠道微生物组及常见抗生素抗性基因的比较[J]. 野生动物学报(FENG Tianshu, YU Qiaoling, ZHOU Rui, *et al.* The comparison of gut microbiome and common antibiotic resistance genes between plateau pika and plateau zokor[J]. Chinese Journal of Wildlife), 2020, 41(4): 897–911.
- [19] ZHOU Y, LU H, LIU Y, *et al.* Cirbp-PSD95 axis protects against hypobaric hypoxia-induced aberrant morphology of hippocampal dendritic spines and cognitive deficits[J]. Molecular Brain, 2021, 14: 129.
- [20] LI J, DONG Z Z, LIU B Q, *et al.* Hypoxia induces beta-amyloid in association with death of RGC-5 cells in culture[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 410(1): 40–44.
- [21] GAO L B, TIAN S, GAO H H, *et al.* Hypoxia increases  $A\beta$ -induced tau phosphorylation by calpain and promotes behavioral consequences in AD transgenic mice[J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2013, 51(1): 138–147.
- [22] 宗咏花. 高原环境诱发认知功能障碍的病理机制研究进展[J]. 神经解剖学杂志(ZONG Yonghua. Research progress on the pathological mechanism of cognitive dysfunction induced by high altitude environment[J]. Chinese Journal of Neuroanatomy), 2022, 38(6): 709–712.
- [23] ROSA E, MAHENDRAM S, KE Y D, *et al.* Tau downregulates BDNF expression in animal and cellular models of Alzheimer's disease[J]. Neurobiology of Aging, 2016, 48: 135–142.
- [24] XIA D Y, HUANG X, BI C F, *et al.* PGC-1 $\alpha$  or FNDC5 is involved in modulating the effects of  $A\beta_{1-42}$  oligomers on suppressing the expression of BDNF, a beneficial factor for inhibiting neuronal apoptosis,  $A\beta$  deposition and cognitive decline of APP/PS1 Tg mice[J]. Frontiers in Aging Neuroscience, 2017, 9: 65.
- [25] GRABRUCKER S, MARIZZONI M, SILAJDŽIĆ E, *et al.* Microbiota from Alzheimer's patients induce deficits in cognition and hippocampal neurogenesis[J]. Brain, 2023, 146(12): 4916–4934.
- [26] HUANG Y, WU J, ZHANG H P, *et al.* The gut microbiome modulates the transformation of microglial subtypes[J]. Molecular Psychiatry, 2023, 28(4): 1611–1621.
- [27] CAMMANN D, LU Y M, CUMMINGS M J, *et al.* Genetic correlations between Alzheimer's disease and gut microbiome genera[J]. Scientific Reports, 2023, 13: 5258.
- [28] WANG T, HU X, LIANG S, *et al.* Lactobacillus fermentum NS9 restores the antibiotic induced physiological and psychological abnormalities in rats[J]. Beneficial Microbes, 2015, 6(5): 707–717.
- [29] WANG J J, QIE J L, ZHU D R, *et al.* The landscape in the gut microbiome of long-lived families reveals new insights on longevity and aging: relevant neural and immune function[J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2107288.
- [30] WELCOME M O. Immunomodulatory functions of the gastrointestinal tract[M]/WELCOME M O. Gastrointestinal Physiology: Development, Principles and Mechanisms of Regulation. Cham: Springer, 2018: 685–771.
- [31] WELCOME M O. Current perspectives and mechanisms of relationship between intestinal microbiota dysfunction and dementia: a review[J]. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra, 2019, 8(3): 360–381.