

益生菌对脑缺血再灌注损伤大鼠 A β 表达的影响及神经元的保护作用

梁国晶¹⁾, 冀琨²⁾, 张恺纯³⁾, 张玉芳⁴⁾, 安晶⁴⁾, 张钰鸽⁵⁾, 文娟¹⁾, 任海燕⁶⁾
(1)新疆医科大学基础医学院病理生理学教研室, 新疆乌鲁木齐 830011; 2)新疆医科大学第六附属医院神经外科, 新疆乌鲁木齐 830011; 3)乌鲁木齐市友谊医院心内科, 新疆乌鲁木齐 830011; 4)新疆维吾尔自治区核酸检测中心/新疆医科大学PCR生物实验室, 新疆乌鲁木齐 830011; 5)长葛市人民医院病理科, 河南长葛 461500; 6)新疆医科大学实验室与设备管理处中心实验室, 新疆乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的 探讨益生菌干预对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 A β 表达的影响及神经元的保护作用。方法 实验动物为雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 随机分为 4 组, 各组 $n = 12$: 假手术组、模型组、益生菌组、依达拉奉组。假手术组仅分离颈总动脉, 其余各组使用线栓法建立脑缺血再灌注模型。脑损伤程度使用神经行为学评分评估; 大鼠脑组织梗死面积使用 TTC 染色观察; 大鼠大脑海马 CA1 区与皮层区神经元病理形态学改变特征使用 HE 染色观察; A β 蛋白的表达使用免疫组化实验检测。结果 模型组相较假手术组, 神经行为学评分升高 ($P < 0.05$), 脑梗死面积增加 ($P < 0.05$), 海马 CA1 区与皮层区神经元出现损伤, A β 蛋白表达显著上调 ($P < 0.001$, $P < 0.05$); 益生菌组、依达拉奉组与模型组相比, 神经行为学评分降低 ($P < 0.05$), 脑梗死面积减小 ($P < 0.05$), 海马 CA1 区与皮层区神经元损伤减轻, A β 蛋白表达水平在两组中均显著下调 ($P < 0.001$, $P < 0.05$); 依达拉奉组改善更为明显。结论 益生菌干预可下调 A β 蛋白的表达, 减轻脑缺血再灌注大鼠脑组织损伤、发挥神经元保护作用。

[关键词] 益生菌; 脑缺血再灌注损伤; β 淀粉样蛋白; 依达拉奉

[中图分类号] R741.02; R363 [文献标志码] A [文章编号] 2095-610X(2024)05-0037-07

The Effect of Probiotics on the Expression of A β and the Protective Effect of Neurons in Rats with Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury

LIANG Guojing¹⁾, JI Kun²⁾, ZHANG Kaichun³⁾, ZHANG Yufang⁴⁾, AN Jing⁴⁾,
ZHANG Yuge⁵⁾, WEN Juan¹⁾, REN Haiyan⁶⁾

(1) *The Basic Medical Department of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830011;*
2) *Dept. of Neurosurgery, The 6th Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830011;*
3) *Dept. of Cardiovascular Medicine, Urumqi Friendship Hospital, Urumqi Xinjiang 830011;*
4) *PCR Biology Laboratory of Xinjiang Medical University, Nucleic Acid Detection Center of Xinjiang Uygur Autonomous Region; Urumqi Xinjiang 830011;*
5) *Dept. of Pathology, Changge Municipal People's Hospital, Changge Henan 461500;*
6) *Central Laboratory of laboratory and Equipment Management Division of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830011, China)*

[Abstract] Objective To explore the effect of probiotics intervention on the expression of A β in rats with cerebral ischemia-reperfusion and the protective effect of neurons. Methods Male SD rats were selected as

[收稿日期] 2024-01-05

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2023D01C38)

[作者简介] 梁国晶(1999~), 女, 甘肃古浪人, 在读硕士研究生, 主要从事神经病理生理学研究工作。

[通信作者] 任海燕, E-mail: 424732833@qq.com

the experimental animals and randomly divided into Sham Group, Model Group, Probiotics Group and Edaravone Group. The common carotid artery was separated only to the Sham Group While a cerebral ischemia-reperfusion model was established to the other groups. The degree of brain injury was evaluated using neurobehavioral scoring; The infarct area of rat brain tissue was observed using TTC staining; HE staining was used to observe the pathological and morphological changes of neurons in the CA1 and cortical regions of the hippocampus in rats; The expression of A β proteins was detected using immunohistochemistry experiments. **Results** Compared with the Sham Group, the Model Group showed an increase in neurobehavioral scores ($P < 0.05$), an increase in cerebral infarction focus ($P < 0.05$), neuronal damage in the hippocampal CA1 and cortical regions, and a significant upregulation of A β protein expression ($P < 0.001$, $P < 0.05$); Compared with the Model Group, the Probiotics Group and Edaravone Group showed a decrease in neurobehavioral scores ($P < 0.05$) and a reduction in cerebral infarction focus ($P < 0.05$). The Probiotic Group and the Edaravone Group showed the less neuronal damage in the hippocampal CA1 and cortical regions, and the A β protein expression levels were significantly down regulated in both groups ($P < 0.001$, $P < 0.05$). The improvement was more significant in Edaravone Group. **Conclusion** Probiotics intervention can downregulate the expression of A β protein, alleviate the brain tissue damage and exert neuroprotective effects in rats with cerebral ischemia-reperfusion.

[**Key words**] Probiotics; Cerebral ischemia-reperfusion injury; β amyloid; Edaravone

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是指因大脑血液循环受阻,脑组织缺血、缺氧引起相应神经功能缺损的 1 组疾病或临床综合征。临床上缺血性脑卒中患者的主要治疗方法为再灌注治疗,旨在神经元损伤前恢复缺血区域的血流和氧气。但再灌注治疗具有局限性,即在进行治疗时脑功能可能会出现更严重的损害,称为脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemic-reperfusion injury, CIRI)^[1]。阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)流行病学表明,脑卒中和 AD 之间存在着密切关联^[2]。前期研究发现, CIRI 后大鼠脑部出现了 AD 相关病理学改变- β 淀粉样蛋白(amyloid beta, A β)的增多^[3],且已有研究证明脑缺血后出现的神经功能障碍与 A β 蛋白的增加有关^[4]。提示 CIRI 与 AD 的病理过程存在一定的交叉, CIRI 与 AD 可能存在共同的治疗靶点^[5-6]。

近年来,关于菌群-肠-脑轴的研究发现,神经系统与肠道菌群可相互调控^[7]。脑缺血再灌注损伤会导致菌群失调、通透性增加、肠道屏障破坏等,影响肠神经系统和中枢神经系统,从而导致或加重疾病^[8]。研究发现,粪便菌群移植、益生菌灌胃、高纤维饮食等改善肠道菌群紊乱的干预措施可调整肠道内有益菌与有害菌比例,恢复肠道稳态,改善神经系统损伤^[9-12]。已有研究表明益生菌干预可改善缺血性脑卒中预后,也可以改善认知功能与情绪^[9, 13]。益生菌在维持机体肠道菌群平衡方面起重要作用,其对宿主健康有益,这类活的微生物制剂能调节肠道内微生物群组成并恢复菌群结构紊乱,使宿主肠道微生物稳态恢

复正常^[14]。正常的肠道菌群是影响神经系统疾病及预后不可或缺的因素。双歧杆菌可抑制人体内有害细菌的生长繁殖预防病原菌感染,在肠道中发挥重要作用。鼠李糖乳杆菌可通过较强的抗炎、抗氧化应激功能调节菌群代谢和保护肠道屏障等,具有临床应用潜力且研究较为广泛。嗜酸乳杆菌可通过释放有益物质促进有益菌的生长,也可通过释放乳酸、乙酸和抗菌素抵抗小肠中的有害细菌。本研究选用三联益生菌:双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌及嗜酸乳杆菌干预脑缺血再灌注(ischemic-reperfusion, I/R)大鼠,观察益生菌干预对脑 I/R 大鼠 A β 表达的影响及神经元的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Sprague-Dawley 大鼠 48 只,雄性,6 周龄,体重(200 \pm 10) g。购自新疆医科大学动物实验中心,实验动物饲养于湿度 45%~55%,温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C 的环境中。本研究经新疆医科大学动物伦理委员会批准 [SYXK(新)2018-0003]。

1.2 试剂与仪器

三联益生菌购于山东中科嘉亿生物工程有限公司;依达拉奉购于扬子江药业有限公司;2,3,5-氯化三苯基四氮唑 TTC 购于 SAGMA;苏木素、伊红染色液、水合氯醛、多聚甲醛固定液购于 Biosharp;一抗 A β 、二抗山羊抗兔购于 Abcam;柠檬酸钠修复液、山羊血清、DAB 显色液购于中杉金桥;大脑中动脉栓塞术线栓购于北京西浓科

技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及模型制备 按随机数字表法^[15]将48只SD大鼠随机分为4组, 每组12只: 假手术组、模型组、益生菌组、依达拉奉组。参考文献中造模方式^[16]: (1)实验动物造模手术前禁食12 h, 10%水合氯醛腹腔注射麻醉(0.35 mL/100 g), 恒温环境25℃, 麻醉后的大鼠仰卧位固定于操作台上; (2)备皮消毒颈部正中皮肤, 切一纵向、长约1.5 cm切口, 按皮下组织、肌组织结构分离暴露颈总动脉、颈内颈外分叉; (3)结扎颈总动脉, 颈内颈外动脉分叉稍下处剪口, 可插入直径0.265 mm的圆头线拴大小即可, 插入线拴约18 mm处停止, 将线拴扎紧固定; (4)脑缺血2 h后将线拴拔出, 缝合后消毒。

1.3.2 给药 三联益生菌液制备: 双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌和嗜酸乳杆菌菌粉以1:1:1比例混合后, 用生理盐水溶解制成 10^8 CFU/mL浓度的复合菌液, 益生菌组大鼠术前与术后用三联益生菌液分别灌胃7 d; 依达拉奉组在再灌注前15 min腹腔注射依达拉奉;

1.3.3 神经行为学评分 大鼠脑缺血再灌注7 d后, 采用Zea Longa5级评分法^[17]进行神经行为学评分, 见表1, 去除4分和0分者, 其余符合标准者进行后续实验。

表1 Zea Longa 5级评分法评分标准

Tab. 1 Zea longa grade 5 scoring method scoring standard

评分	表现
0	无神经损害症状
1	梗死侧对侧前肢和前爪不能完全伸展
2	不能正常行走, 行走时向梗死侧旋转
3	行走时向梗死对侧倾倒
4	无法行走和意识障碍

1.3.4 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色 大鼠脑缺血再灌注7 d后, 将大鼠麻醉后分离出全脑组织, 切5层、厚2 mm的脑片后, 浸入TTC溶液中, 避光染色30 min。染色后观察并拍照, Image J软件计算各组大鼠脑梗死面积。

1.3.5 HE染色 每组随机抽取3只大鼠, 参考课题组前期实验方法^[17], (1)大鼠麻醉(10%水合氯醛)后使用磷酸缓冲液行心内灌注; (2)快速断头取脑多聚甲醛固定, 石蜡包埋后行冠状切片; (3)二甲苯脱蜡, 乙醇梯度去除二甲苯; (4)苏木素染色, 流水冲洗反蓝; (5)伊红液染色后用乙醇

脱水, 二甲苯透明, 自然晾干片子后中性树脂封片; (6)每张切片在400 \times 光镜视野下拍摄。

1.3.6 免疫组化 每组随机抽取5只大鼠, 灌注固定与石蜡包埋同HE染色步骤。(1)切片脱蜡水化; 3% H₂O₂室温下孵育10 min; 微波修复抗原; (2)山羊血清封闭后甩干切片, 滴加兔A β 抗体(1:50)4℃过夜; (3)室温环境复温1 h, PBST洗去一抗后滴加山羊抗兔二抗(1:1000)37℃孵育20 min; (4)洗去二抗后, DAB显色, 随时在显微镜下观察并中止染色; 苏木素复染, 盐酸乙醇分化, 流水下返蓝; (5)染色结束, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 自然晾干片子后中性树脂封片; (6)每张切片各取5个400 \times 视野, 测定各组阳性积分光密度(integrated optical density, IOD)及面积(Area), 取其比值为该组切片的平均光密度(mean optical density, MOD), 进行统计学比较。

1.4 统计学处理

数据统计分析软件采用GraphPad Prism 9.0软件, 计量资料表示为均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$), 多组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 益生菌对脑 I/R 大鼠神经行为学评分的影响

假手术组未出现神经功能损伤, 模型组神经行为学评分结果为(3.508 \pm 0.412)分, 提示明显出现神经功能损害症状, 如向右侧旋转、行走时向右侧倾斜等。相较模型组, 益生菌组与依达拉奉组神经行为学评分结果为(2.53 \pm 0.41)分、(2.274 \pm 0.196)分, 均显著低于模型组($P < 0.05$), 依达拉奉组神经功能损伤改善更显著, 见表2。

2.2 益生菌对脑 I/R 大鼠脑梗死面积的影响

脑组织TTC染色后, 梗死区域呈白色, 正常区域呈红色。使用Image J软件计算脑组织梗死面积。假手术组梗死面积为0; 模型组梗死面积为(21.558 \pm 2.238)%, 相较假手术组显著增大($P < 0.05$); 益生菌组梗死面积(9.482 \pm 1.428)%, 依达拉奉组梗死面积(6.988 \pm 1.322)%, 相较模型组, 益生菌组和依达拉奉组脑部梗死面积显著减少($P < 0.05$), 依达拉奉组改善效果更为明显, 见图1、表3。

2.3 益生菌对脑 I/R 大鼠神经元病理形态学的影响

HE染色后观察大鼠大脑海马CA1区, 假手术组海马CA1区神经细胞排列整齐, 胞核位居胞

表 2 各组大鼠神经行为学评分 $[(\bar{x} \pm s), \text{分}]$ Tab.2 Neurobehavioral scores of rats in each group $[(\bar{x} \pm s), \text{points}]$

分组	<i>n</i>	神经行为学评分
假手术组	12	0±0*
模型组	12	3.51±0.41
益生菌组	12	2.53±0.41*
依达拉奉组	12	2.27±0.20*

与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

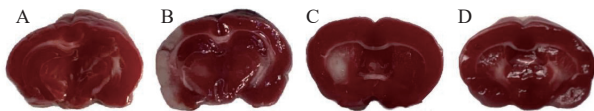


图 1 各组大鼠脑组织脑梗死灶

Fig. 1 Cerebral infarction focus of rats in each group

A: 假手术组; B: 模型组; C: 益生菌组; D: 依达拉奉组。

表 3 各组大鼠脑组织脑梗死灶体积的比较 $[(\bar{x} \pm s)\%]$ Tab.3 Comparison of cerebral infarction focus volume of rats in each group $[(\bar{x} \pm s)\%]$

分组	<i>n</i>	脑梗死体积百分比
假手术组	3	0±0*
模型组	3	21.56±2.24
益生菌组	3	9.48±1.43*
依达拉奉组	3	6.99±1.32*

与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

体中央, 形态正常, 可见清晰的核仁; 与假手术比较, 模型组缺血侧海马 CA1 区神经细胞排列变形, 胞核皱缩变小, 核染色质固缩, 胞浆皱缩; 益生菌组和依达拉奉组相较模型组, 海马 CA1 区神经细胞排列较规则, 神经元脱失不明显, 细胞皱缩减轻, 神经元损伤改善, 依达拉奉组改善效果更为明显, 见图 2。

HE 染色后观察大鼠大脑皮层区, 假手术组大脑皮层区神经元排列结构完整, 细胞核染色清楚, 形态完整; 模型组相较假手术组, 组织结构破坏明显, 神经元变性坏死, 细胞核固缩; 益生菌组和依达拉奉组相较模型组, 大脑皮层区组织结构损伤相对减轻, 神经元排列较为正常, 核固缩减轻, 依达拉奉组改善效果更为明显, 见图 2。

2.4 益生菌对脑 I/R 大鼠 A β 表达的影响

免疫组化检测结果显示, 大鼠大脑海马 CA1 区与皮层区 A β 阳性染色呈棕黄色颗粒状, 分布

不均匀; 对不同分组之间 A β 免疫组化染色结果的 IOD 值进行分析, 结果提示: 在假手术组中, 未见到明显 A β 阳性染色; 而在模型组中, 可以看到明显的 A β 阳性染色, 与假手术组相比, 海马 CA1 区 ($P < 0.001$) 与皮层区 ($P < 0.05$) A β 蛋白的表达差异有统计学意义; 而给予益生菌和依达拉奉干预后, 海马 CA1 区 ($P < 0.001$) 与皮层区 ($P < 0.05$) 神经元 A β 阳性染色程度相比于模型组显著减轻, A β 蛋白的表达差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3、4。

3 讨论

IS 由于高发病率和致残率, 给家庭和社会造成严重负担。临床上 IS 患者的主要治疗方法为再灌注治疗^[18], 但再灌注治疗具有局限性, 在进行治疗时可能会出现更严重的脑缺血再灌注损伤。从新的角度研究缺血性脑卒中溶栓后再灌注损伤相关的病理机制对于 CIRI 及 CIRI 预后相关疾病的治疗极其重要。脑卒中或短暂性脑缺血发作后, AD 的风险也显著增加。研究调查表明, 如果患者先前患有 AD, 脑卒中将会使患者的认知能力进一步下降。在大多数 AD 病例中, 30% 会出现脑梗死, 2 者具有相同的病理特征: A β 和 tau 蛋白增加^[19-20]。A β 由淀粉样前体蛋白经过水解作用产生, 广泛存在于 AD 患者脑和脊髓中^[21], 在神经变性疾病及认知行为异常疾病中起着关键作用。

既往研究报道^[22], 神经系统疾病与菌群-肠-脑轴可能存在密切关联。该轴的机制包括: 肠道菌群产生的神经递质经肠道神经细胞到达中枢神经系统; 肠道菌群的代谢产物影响中枢神经系统。脑缺血再灌注后肠道菌群出现紊乱, 随后影响神经系统的功能, 在 AD 中也有类似表现^[23]。肠道菌群中有益菌与有害菌的种类、丰度长期处于动态平衡的状态, 肠道微生态才能得以维持。

本研究中, 采用线栓法制备脑缺血再灌注损伤大鼠模型, 分别给予三联益生菌与依达拉奉干预。结果显示, 大鼠脑缺血再灌注损伤后神经行为学评分增高提示造模成功, 与王亚南等^[24]的研究结果一致; 益生菌组与依达拉奉组神经功能损伤均减轻, 依达拉奉组减轻效果更明显, 提示益生菌能改善脑缺血再灌注后大鼠神经功能损伤。本研究还发现, 在 TTC 染色结果中, 模型组大鼠出现典型的脑梗死灶, 给予益生菌与依达拉奉干

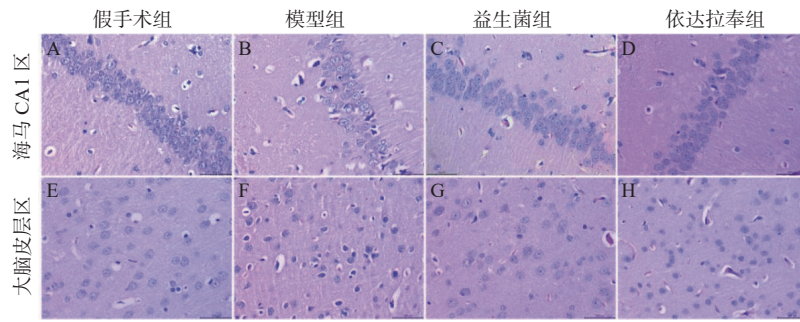


图 2 各组大鼠大脑海马 CA1 区与皮层区神经元病理形态学改变 ($\times 400$)

Fig. 2 Pathological and morphological changes of neurons in the hippocampus CA1 and cortical regions of rats in each group ($\times 400$)

A ~ D: 大鼠海马 CA1 区神经元病理形态学改变; E ~ H: 大鼠皮层区神经元病理形态学改变。

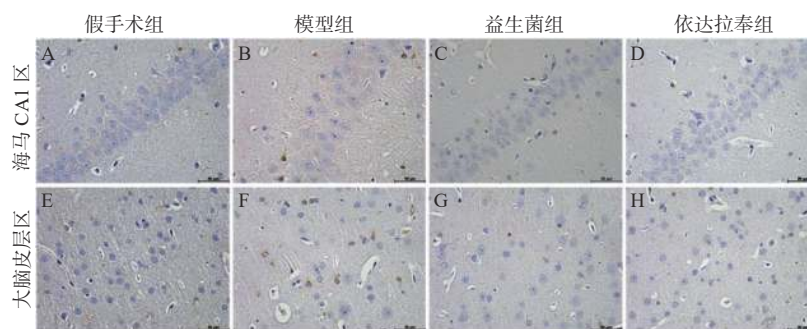


图 3 各组大鼠大脑海马 CA1 区与皮层区 A β 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of A β protein in the hippocampal CA1 and cortical regions of rats in each group

A ~ D: 大鼠海马 CA1 区神经元 A β 蛋白表达情况; E ~ H: 大鼠皮层区神经元 A β 蛋白表达情况。

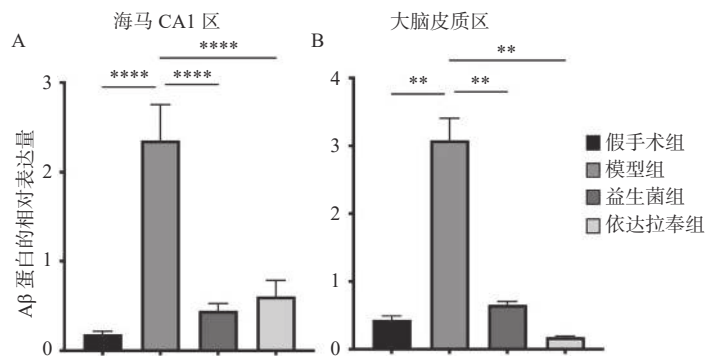


图 4 各组大鼠大脑海马 CA1 区与皮层区 A β 蛋白的表达比较

Fig. 4 Comparison of protein expression in the hippocampal CA1 and cortical regions of rats in each groups

A: 大鼠大脑海马 CA1 区 A β 蛋白的表达统计图; B: 大鼠大脑皮层区 A β 蛋白的表达统计图与模型组比较, $**P < 0.05$, $****P < 0.001$ 。

预减小了脑梗死灶面积; HE 染色结果显示, 模型组脑组织神经元结构破坏, 排列紊乱、损伤明显, 益生菌组与依达拉奉组神经细胞未发生明显变性坏死, 依达拉奉组改善效果更为显著。较多的研究发现, 神经系统损伤小鼠补充益生菌后, 肠道菌群的丰度与组成改变, 神经元损伤以及认知功能障碍显著改善^[9, 14, 25]。

相关研究发现益生菌可改善 A β 诱导的 AD

大鼠模型的空间学习能力^[26], 减少其脑组织 A β 的产生和沉积, 减轻其认知功能障碍^[21]。调节肠道菌群可以显著减少 AD 模型小鼠脑中的 A β 斑块沉积、Tau 蛋白过磷酸化, 改善其神经系统功能缺失^[27]。本研究中, 模型组大鼠大脑海马 CA1 区与皮质区 A β 蛋白表达增加, 益生菌组与依达拉奉组相较模型组 A β 蛋白表达均减少, 与上述研究结果一致。依达拉奉为一种氧自由基清除剂,

具有较强的神经保护作用。在本课题组前期实验中,发现依达拉奉可显著改善脑缺血再灌注 24h 后大鼠神经元形态学损伤并下调 A β 蛋白表达^[28],与本研究结果一致。

综上所述,对脑缺血再灌注损伤大鼠采用益生菌灌胃能改善其神经功能缺损症状,改善脑梗死面积与神经元损伤,下调 A β 蛋白的表达,推测 A β 蛋白可能是 CIRI 过程中的重要致病因素之一,而肠道菌群可能成为改善 CIRI 的潜在靶点。随着菌群-肠-脑轴的研究深入,肠道菌群在神经系统疾病中发挥着不可忽视的作用。脑缺血再灌注后可出现肠道菌群多样性、丰度及构成改变,而益生菌可以直接到达肠道调节肠道菌群,改变肠道微生物的组成,并减轻肠道病原微生物对大脑功能的损伤^[29]。推测益生菌可能通过调节有益菌与有害菌的比例,恢复肠道菌群稳态,产生神经递质、代谢产物等途径影响肠神经系统和中枢神经系统,从而改善神经系统损伤^[30]。但通过调节 CIRI 大鼠肠道菌群改善其神经功能损伤的具体作用机制仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Savitz S I, Baron J C, Yenari M A, et al. Reconsidering neuroprotection in the reperfusion era[J]. *Stroke*, 2017, 48(12): 3413-3419.
- [2] Pawar A, Pardasani K R. Mechanistic insights of neuronal calcium and ip3 signaling system regulating atp release during ischemia in progression of Alzheimer's disease[J]. *Eur Biophys J*, 2023, 52(3): 153-173.
- [3] Ren H, Ma L, Gong X, et al. Edaravone exerts brain protective function by reducing the expression of aqp4, app and a β proteins[J]. *Open Life Sci*, 2019, 14(1): 651-658.
- [4] Pluta R, Ułamek-Kozioł M, Januszewski S, et al. Participation of amyloid and tau protein in neuronal death and neurodegeneration after brain ischemia[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13): 4599.
- [5] Ułamek-Kozioł M, Czuczwar S J, Januszewski S, et al. Proteomic and genomic changes in tau protein, which are associated with Alzheimer's disease after ischemia-reperfusion brain injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 892.
- [6] Nguyen T-V V, Hayes M, Zbesko J C, et al. Alzheimer's associated amyloid and tau deposition co-localizes with a homeostatic myelin repair pathway in two mouse models of post-stroke mixed dementia[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2018, 6(1): 100.
- [7] Wang J, Zhang H, He J, et al. The role of the gut microbiota in the development of ischemic stroke[J]. *Front Immunol*, 2022, 28(13): 845243.
- [8] Benakis C, Poon C, Lane D, et al. Distinct commensal bacterial signature in the gut is associated with acute and long-term protection from ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2020, 51(6): 1844-1854.
- [9] Li H, Sun J, Du J, et al. Clostridium butyricum exerts a neuroprotective effect in a mouse model of traumatic brain injury via the gut-brain axis[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2018, 30(5): e13260.
- [10] 冯云, 亢君君, 方宗平, 等. 肠道菌群移植通过降低 il-17 水平减轻老年小鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019, 35(1): 52-57.
- [11] Wang H, Ren S, Lv H, et al. Gut microbiota from mice with cerebral ischemia-reperfusion injury affects the brain in healthy mice[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(7): 10058-10074.
- [12] Wu H, Chiou J. Potential benefits of probiotics and prebiotics for coronary heart disease and stroke[J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2878.
- [13] Pan F, Zhang L, Li M, et al. Predominant gut lactobacillus murinus strain mediates anti-inflammatory effects in calorie-restricted mice[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 54.
- [14] Akhoundzadeh K, Vakili A, Shadnough M, et al. Effects of the oral ingestion of probiotics on brain damage in a transient model of focal cerebral ischemia in mice[J]. *Iran J Med Sci*, 2018, 43(1): 32-40.
- [15] 刘兆兰, 刘宝全, 李兰花, 等. 动态随机分组方法介绍及应用 [J]. *中西医结合学报*, 2011, 9(3): 246-251.
- [16] 梁国晶, 任海燕, 张钰鸽, 等. 红茶菌在脑缺血再灌注损伤大鼠模型中的作用研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2023, 23(3): 428-432.
- [17] 卢小叶, 吕倩忆, 李棋龙, 等. Zea-longa 评分与改良 Garcia 评分应用于针刺治疗 CIRI 大鼠神经功能缺损评估的研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(9): 1356-1360.
- [18] Li Y, Zhang J. Animal models of stroke[J]. *Animal Model Exp Med*, 2021, 4(3): 204-219.
- [19] Maida C D, Norrito R L, Daidone M, et al. Neuroinflam-

- matory mechanisms in ischemic stroke: Focus on cardioembolic stroke, background, and therapeutic approaches[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6454.
- [20] Dai S J, Zhang J Y, Bao Y T, et al. Intracerebroventricular injection of a β 1–42 combined with two–vessel occlusion accelerate Alzheimer's disease development in rats[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(10): 1583–1595.
- [21] Pluta R, Miziak B, Czuczwar S J. Post–ischemic permeability of the blood–brain barrier to amyloid and platelets as a factor in the maturation of Alzheimer's disease–type brain neurodegeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 10739.
- [22] Loh J S, Mak W Q, Tan L K S, et al. Microbiota–gut–brain axis and its therapeutic applications in neurodegenerative diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 37. Published 2024 Feb 16.
- [23] Abdelhamid M, Zhou C, Ohno K, et al. Probiotic bifidobacterium breve prevents memory impairment through the reduction of both amyloid– β production and microglia activation in app knock–in mouse[J]. *J Alzheimers Dis*, 2022, 85(4): 1555–1571.
- [24] 王亚南, 陈真珍, 王凯华, 等. 补阳壮通饮对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用及其可能机制研究 [J]. *医学研究杂志*, 2024, 53(4): 40–45.
- [25] 杨梅芳, 程萍, 陈治任, 等. 肠道菌群代谢产物 TMAO 激活 HMGB1/NLRP3 炎症通路促进小鼠脑缺血半暗带损伤的机制研究 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2023, 40(12): 1096–1100.
- [26] Gilbert K, Arseneault–Bréard J, Flores Monaco F, et al. Attenuation of post–myocardial infarction depression in rats by n–3 fatty acids or probiotics starting after the onset of reperfusion[J]. *Br J Nutr*, 2013, 109(1): 50–56.
- [27] Rezaeiasl Z, Salami M, Sepehri G. The effects of probiotic lactobacillus and bifidobacterium strains on memory and learning behavior, long–term potentiation (ltp), and some biochemical parameters in β –amyloid–induced rat's model of alzheimer's disease[J]. *Prev Nutr Food Sci*, 2019, 24(3): 265–273.
- [28] 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.
- [29] 任海燕, 赵晖, 王蕾, 等. 依达拉奉对脑缺血再灌注后 a β 及其前体表达干预 [J]. *科技导报*, 2015, 33(12): 77–82.
- [30] Ye T, Yuan S, Kong Y, et al. Effect of probiotic fungi against cognitive impairment in mice via regulation of the fungal microbiota–gut–brain axis[J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(29): 9026–9038.