

松茸提取物改善 AD 模型小鼠认知障碍与作用机制

王洋, 李金璧, 刘夫锋*

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 为了研究松茸提取物 (TM) 对阿尔兹海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 模型小鼠的保护机制, 利用脑注射 $A\beta_{42}$ 寡聚体诱导建立 AD 小鼠模型, 评估行为学、神经炎症、氧化应激与肠道菌群相关指标。结果显示, 松茸提取物显著改善了 AD 小鼠的行为与认知障碍。AD 病理标志物炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 及氧化应激标志物 MDA 的水平在模型组显著升高, 但这些变化通过抗炎因子 IL-10 及抗氧化酶 SOD 和 GSH 的上调得以逆转。与模型组相比, TNF- α 和 IL-1 β 的表达量分别显著减少了 53.98% 和 53.41%; 抗氧化酶 SOD 和 GSH 的水平则分别显著上升了 88.46% 和 40.24%。小胶质细胞 IBA-1 与星形胶质细胞 GFAP 的表达量显著降低 61.39%、55.82%。肠道菌群分析显示, TM 能够有效恢复 AD 小鼠的肠道菌群失调, 显著增加产短链脂肪酸 (SCFA) 菌属的相对丰度, 而与炎症相关的菌属相对丰度则显著减少。Firmicutes/Bacteroidetes 比值回调进一步表明肠道微生物失衡得以改善。综上所述, 松茸提取物能够有效改善神经炎症与氧化应激, 恢复肠道菌群失调, 发挥改善 AD 小鼠认知障碍功能, 在抗 AD 方面显示出巨大潜力。

关键词: 松茸提取物; 阿尔兹海默病; 神经炎症; 肠道菌群

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.12.1281

Tricholoma Matsutake Extract Improves Cognitive Impairment in AD Model Mice and Its Mechanism

WANG Yang, LI Jinbi, LIU Fufeng*

(College of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To investigate the protective mechanism of Tricholoma Matsutake extract (TM) on AD mice, an AD mouse model was established using brain injection of $A\beta_{42}$ oligomers, and behavioral, neuroinflammatory, oxidative stress, and gut microbiota-related indicators were assessed. The findings demonstrated that 2g/kg TM significantly improved behavior and cognitive impairment. Pathological markers of AD, including inflammatory factors TNF- α , IL-1 β , and MDA, were elevated in the model mice. However, these changes were reversed by the upregulation of the anti-inflammatory factor IL-10 and the antioxidant enzymes SOD and GSH. Compared to the model group, the expression levels of inflammatory factors TNF- α and IL-1 β were significantly reduced by 53.98% and 53.41%, while the levels of antioxidant enzymes SOD and GSH increased significantly by 88.46% and 40.24%, respectively. Additionally, TM inhibited the activation of microglial cell marker IBA-1 and astrocyte marker GFAP, with expression levels significantly decreased by 61.39% and 55.82%. These results indicate that TM improves neural damage by reducing neuroinflammation and oxidative stress. 16S rRNA sequencing results indicated that TM effectively restores dysbiosis in AD mice, significantly increasing the relative abundance of SCFA-producing genera such as Lachnospiraceae, Lactobacillus, and Prevotellaceae, while significantly decreasing the abundance of the inflammation-related Proteobacteria. The adjustment of the Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) ratio further suggests that the imbalance of gut microbiota has been ameliorated. In summary, TM was found to effectively improve neuroinflammation, reduce oxidative stress, and restore gut microbiota dysbiosis, which collectively enhanced cognitive function in AD mice. Based on these findings, TM shows great potential in the treatment of AD.

Key words: Alzheimer's disease; Tricholoma Matsutake extract; neuroinflammation; gut microbiota

阿尔兹海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 是世界上发病率最高的神经退行性疾病, 其发生与年龄因素密切相关。在临床上, 阿尔兹海默症患者通常表现出记忆力丧失、情绪变化社交退缩以及思维行动能力的下降^[1]。其

收稿日期: 2024-08-29; 修回日期: 2024-11-09; 接受日期: 2024-11-22

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFC2102700)

作者简介: 王洋 (1999-), 女, 硕士, 研究方向: 功能食品开发, E-mail: wangyangswag@163.com

通讯作者: 刘夫锋 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 抗衰老痴呆功能食品开发, E-mail: fufengliu@tust.edu.cn

主要组织病理学特征为 β -淀粉样蛋白 (Amyloid β -Protein, A β) 沉积与细胞内神经原纤维缠结的形成。这些病理变化与神经细胞的功能衰退与损伤密切相关。最近的研究强调了肠道微生物群及其代谢物在 AD 发病机制中的重要作用,表明微生物失衡可能通过各种途径影响大脑功能,包括炎症反应的调节以及代谢物和神经递质的产生^[2-4]。这导致人们考虑将肠道微生物群调节作为 AD 的潜在治疗途径。

目前用于治疗阿尔茨海默病的西药均仅为对症治疗,途径单一,疗效有限且不良反应较大^[5]。这促使研究者们寻求天然产物作为替代治疗方案。松茸是一种珍贵的天然食药菌,有“真菌之王”的美誉,过去多用于强身、益肠胃、止痛等。其水提物 (Tricholoma Matsutake Extract, TM) 中的水溶性多糖成分已被证明具有抗炎、增强免疫系统、抗氧化等多种功效^[6],使其在食品与医药领域展现出极大潜力与应用价值。Li 等^[7]证实了 TM 能显著改善炎性细胞因子的产生,阻止活性氧的积累,并可能对脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 诱导的细胞损伤产生整体保护作用。Liu 等^[8]证实 TM 能促进体内外神经元细胞再生,并能显著抑制神经炎症反应。TM 对大脑和胃肠道的多重保护作用提示其可能通过减少脑损伤和调节肠道菌群,在 AD 的治疗中发挥积极作用。该研究通过脑部注射 A β ₄₂ 寡聚体的方式建立 AD 模型小鼠,探讨 TM 对 AD 模型小鼠症状的缓解及部分作用机理,为松茸作为 AD 潜在治疗方法的临床应用提供理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SPF 级 C57BL/6J 小鼠,健康雄性,7 周龄,购自杭州子源实验动物技术有限公司,许可证为: SCXK (浙) 2019-0004,体重平均为 20 g 左右。该研究中的动物实验获得天津科技大学伦理委员会的批准(批准号: 20230227)。

松茸购自中国云南香格里拉当地市场。A β ₄₂, 购自吉尔生化(上海)有限公司;试剂盒 (BCA、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (Glutathione, GSH-PX)、Elisa IL-10、Elisa TNF- α 与 Elisa IL-1 β), 均购自北京索莱宝科技有限公司;抗体 IBA-1 rabbit mAb (17198S)、GFAP rabbit mAb (80788S)、TNF- α rabbit mAb (11948S)、IL-1 β rabbit mAb (31202S)、IL-10 rabbit pAb (bs-0698R)、 β -Tubulin (2128S)、Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (7074S) 抗体均购自 CST。

1.2 实验仪器

68025 脑立体定位仪,深圳市瑞沃德生命科技有限公司;DB001 动物行为测试系统,北京智鼠多宝生物科技有限责任公司;1500 全波长酶标仪, Thermo Fisher Scientific; 国标 78001 微型手持式颅钻,深圳市瑞沃德生命科技有限公司;LEICA RM2245 病理切片机,上海徠卡仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 松茸提取物的制备

冻干处理和粉碎松茸子实体获得松茸粉末。随后按照每克松茸粉末加入 50 mL 水的比例混合,于 90 °C 下浸泡 2 h,提取两次。离心分离出上清液与固体颗粒。逐渐向上清液中加入无水乙醇,4 °C 静置 24 h。沉淀物经 60 °C 蒸发浓缩 12 h。利用 Sevag 法除蛋白,冷冻干燥 24 h 后得到棕色绒状的松茸提取物。苯酚-硫酸法^[9]测得松茸提取物的多糖质量分数为 40.37%。

1.3.2 A β 寡聚体的制备

A β 寡聚体的制备方法参考 Huang 等^[10],并略作修改。向分装好的存放 0.3 mg A β ₄₂ 单体的无菌 EP 管中加入 120 μ L 六氟异丙醇 (Hexafluoroisopropanol, HFIP),室温下静置 20 min;后加入 1 080 μ L 超纯水将 HFIP 稀释至 10% 的体积分数,室温静置 10 min;打开氮吹仪,将液体体积吹至 840~900 μ L,待无刺激性气味后将其固定于水平摇床,室温震荡过夜,现配现用,4 °C 保存。

1.3.3 AD 小鼠模型的构建与给药过程

方法参考余虹霓等^[11]的方法,并略作修改。将健康的 SPF 级 C57BL/6J 小鼠随机性分配分成五组,分别为 WT 组、模型组、0.5 g/kg TM 处理组、1 g/kg TM 处理组、2 g/kg TM 处理组。每组 8 只。模型组和处理组的小鼠均通过腹腔注射 1.25% 体积分数的阿佛丁 (0.3~0.5 mL) 实现麻醉。随后将 1 μ L 0.3 mg/mL 质量浓度的 A β ₄₂ 寡聚

体注射到小鼠大脑海马区。每天分别给处理组小鼠腹腔注射 0.5、1 和 2 g/kg 的松茸提取物，持续 21 d。WT 组和模型组的小鼠注射 0.9% 质量分数的 NaCl。

1.3.4 Morris 水迷宫 (Morris Water Maze, MWM) 实验

方法参考 Olivia 等^[12]的方法，并略作修改。小鼠灌胃药物 12 d 后开始 MWM 实验。水池平均分成四个象限区域。将平台放于第一象限的中间位置，第 1 d 将平台置于水上约 1 cm 处。第 2~7 d 增加水量将平台淹没。小鼠找到平台的时间在该实验中称为逃逸潜伏期。成功找到平台后，确保其在平台停留 15 s 以上；未找到平台的小鼠则需用引导棒强制引导至平台并使其停留 15 s 以上。第 8 d 移除平台，再次放入水池第四象限，记录小鼠穿过原平台位置的次数和停留时间。

1.3.5 新物体识别 (Novel Object Recognition, NOR) 实验

NOR 实验用于评估小鼠记忆认知功能。方法参考 Olivia 等^[12]的方法，并略作修改。评估小鼠训练后碰触新旧物体的次数。计算得出鉴别指数 (Discrimination Index, DI) 和认知指数 (Recognition Index, RI)。

1.3.6 血清和组织的采集与储存

眼球取血后将血液储存于灭菌后的 EP 管中静置，离心后吸取上层血清存于 -20 °C，以供炎症因子和氧化应激因子的检测。小鼠左脑与肠道内容物存放至灭菌后的 EP 管中，液氮速冻保存至 -80 °C，用于蛋白免疫印记 (Western Blot, WB) 实验和肠道菌群检测。将小鼠右脑保存至含 4% 的多聚甲醛的 EP 管中，用于 HE 染色和免疫组化染色。

1.3.7 免疫组织化学染色

方法参考 Mu 等^[13]的方法，并略作修改。脑切片用质量分数 3% 的 H₂O₂ 处理并孵育 10 min，PBS 清洗。加入山羊血清封闭 30 min，加入稀释后的 IBA-1 (1:400) 和 GFAP (1:500) 一抗，4 °C 过夜孵育。PBS 洗涤后加入适量山羊抗兔二抗，室温孵育 30 min。PBS 洗涤后用二氨基联苯胺 (3,3'-Diaminobenzidine, DAB) 着色液染色。光学显微镜下观察拍摄图像。采用 Image J 软件分析。

1.3.8 海马区苏木精-伊红 (Hematoxylin-Eosin Staining, HE) 染色

方法参考杨挺等^[14]的方法。使用光学显微镜观察小鼠海马区的病理学变化。

1.3.9 Western blot 分析

方法参考 Zhao 等^[15]的方法，并略作修改。脑与裂解液和蛋白酶抑制剂按比例混合研磨。离心取上清，定量蛋白。用质量分数为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶分离后进行转膜和封闭处理。将聚偏二氟乙烯 (Polyvinylidene Difluoride, PVDF) 膜用 TBST 溶液洗三次，加入按照比例稀释的抗体，4 °C 过夜孵育。取出 PVDF 膜，用缓冲液 (Tris Buffered Saline with Tween 20T, BST) 清洗膜的同时回收一抗，结束孵育二抗，室温震荡 2 h。重复上述清洗过程，结束后关闭灯光，在 PVDF 膜上滴加显色液，凝胶成像仪中扫描，采用 Image J 软件定量。

1.3.10 16s rRNA 测序及肠道微生物数据分析

采用 DNA 抽提试剂盒提取粪便样本 DNA 并检测 DNA 纯度和浓度，选择特异引物后进行 PCR 扩增。纯化反应产物，然后进行第二轮聚合酶链式反应。利用 Illumina NovaSeq 6000 平台对混合样本进行细菌 rRNA 基因的高通量测序分析。采用 Shannon 指数分析 Alpha 多样性，采用主坐标分析 (Principal Coordinate Analysis, PCoA) 和非度量多维尺度 (Non-metric Multidimensional Scaling, NMDS) 确定 Beta 多样性。在门与属水平上进行物种多样性分析。采用线性判别分析 (Linear Discriminant Analysis, LDA) 效应大小 (Linear Discriminant Analysis Effect Size, LEfSe) 检测不同分类水平上细菌相对丰度的显著差异。

1.4 统计与分析

实验结果以平均值±标准差 (mean±SD) 的方式表示。采用 one-way ANOVA 方差分析进行数据统计， $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。与 Model 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ ；与 WT 组比较# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ ，#### $P < 0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 松茸提取物改善 A β ₄₂ 海马区注射小鼠的行为与认知障碍

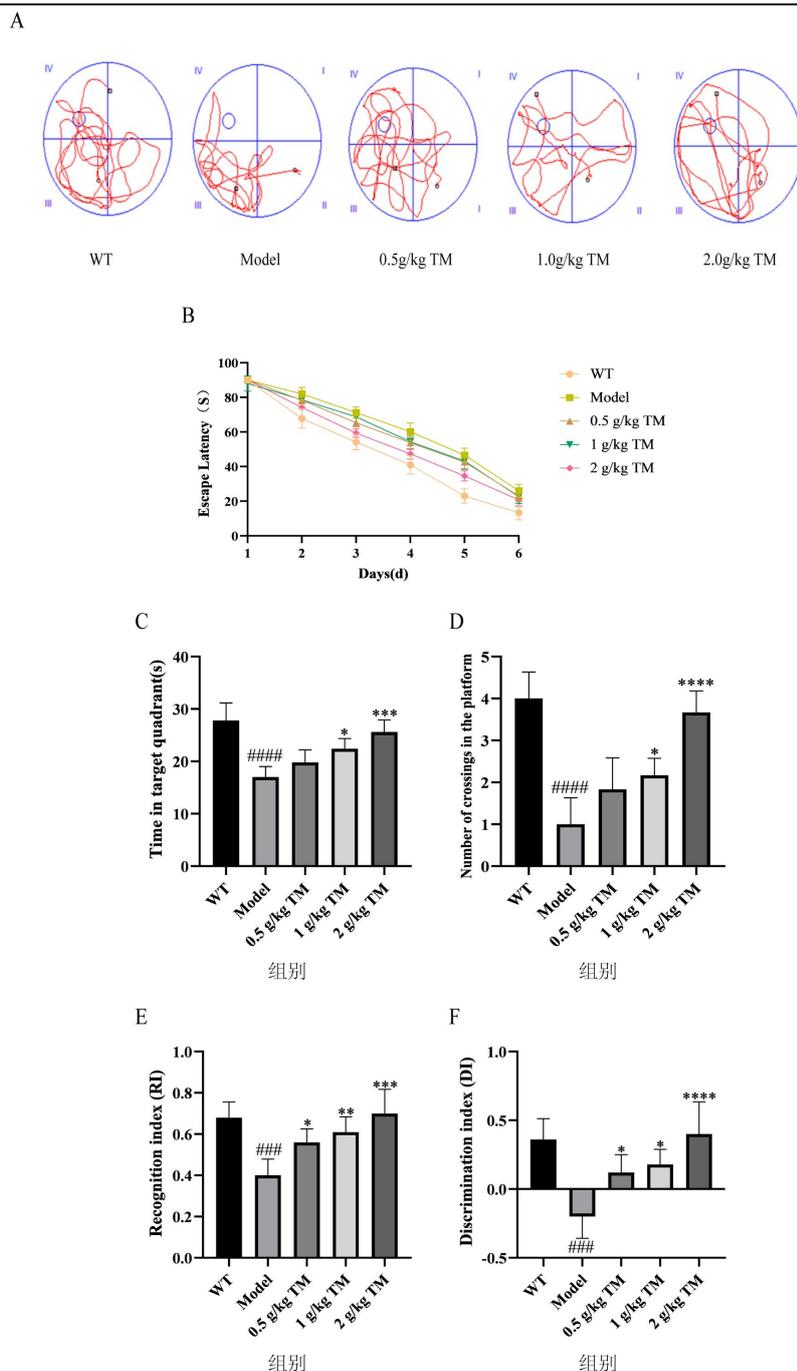


图1 松茸提取物延缓AD模型小鼠认知与行为障碍

Fig.1 TM alleviates Cognitive impairment in AD model mice

注: A 表示小鼠的水迷宫行动路径; B 表示各组小鼠的逃逸时间; C 表示各组小鼠在目标象限停留的时间; D 表示各组小鼠穿越平台次数; E 表示各组小鼠的认知指数; F 表示各组小鼠的鉴别指数。与 Model 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与 WT 组比较#### $P < 0.0001$, ##### $P < 0.00001$ 。下同。

AD 患者通常表现为渐进性的记忆力退化和严重的认知功能障碍。通过 MWM 实验与 NOR 实验评估小鼠行为与学习障碍。小鼠的 MWM 运动轨迹如图 1A 所示。与 WT 组相比较, AD 模型组小鼠逃避潜伏期延长,说明造模成功;与模型组比较, TM 治疗组逃避潜伏期缩短(图 1B)。此外,图 1C、D 显示,与对照组相比,模型组小鼠逃逸时间增加,在目标象限的停留时间降低,穿越平台次数减少($P < 0.001$)。与模型组相比, 2 g/kg TM 组的小鼠平均在目标象限的停留时间与穿越平台次数提高,与模型组有显著性差异($P < 0.01$),说明 TM 对 AD 模型小鼠的空间认知障碍有明显的改善作用。

NOR 实验结果如图 1E、F 所示, WT 组 RI 和 DI 指数分别为 0.68 和 0.36, 较模型组小鼠高出 0.28 和 0.56, 具有显著性差异 ($P<0.001$)。与模型组相比, 2 g/kg TM 组的 RI 和 DI 指数分别增加了 0.3 和 0.6 ($P<0.01$)。说明 TM 处理组小鼠对新物体的探索明显提升, 松茸提取物对 AD 模型小鼠的学习认知能力有明显的改善作用。

2.2 松茸提取物缓解 AD 模型小鼠海马区的神经炎症

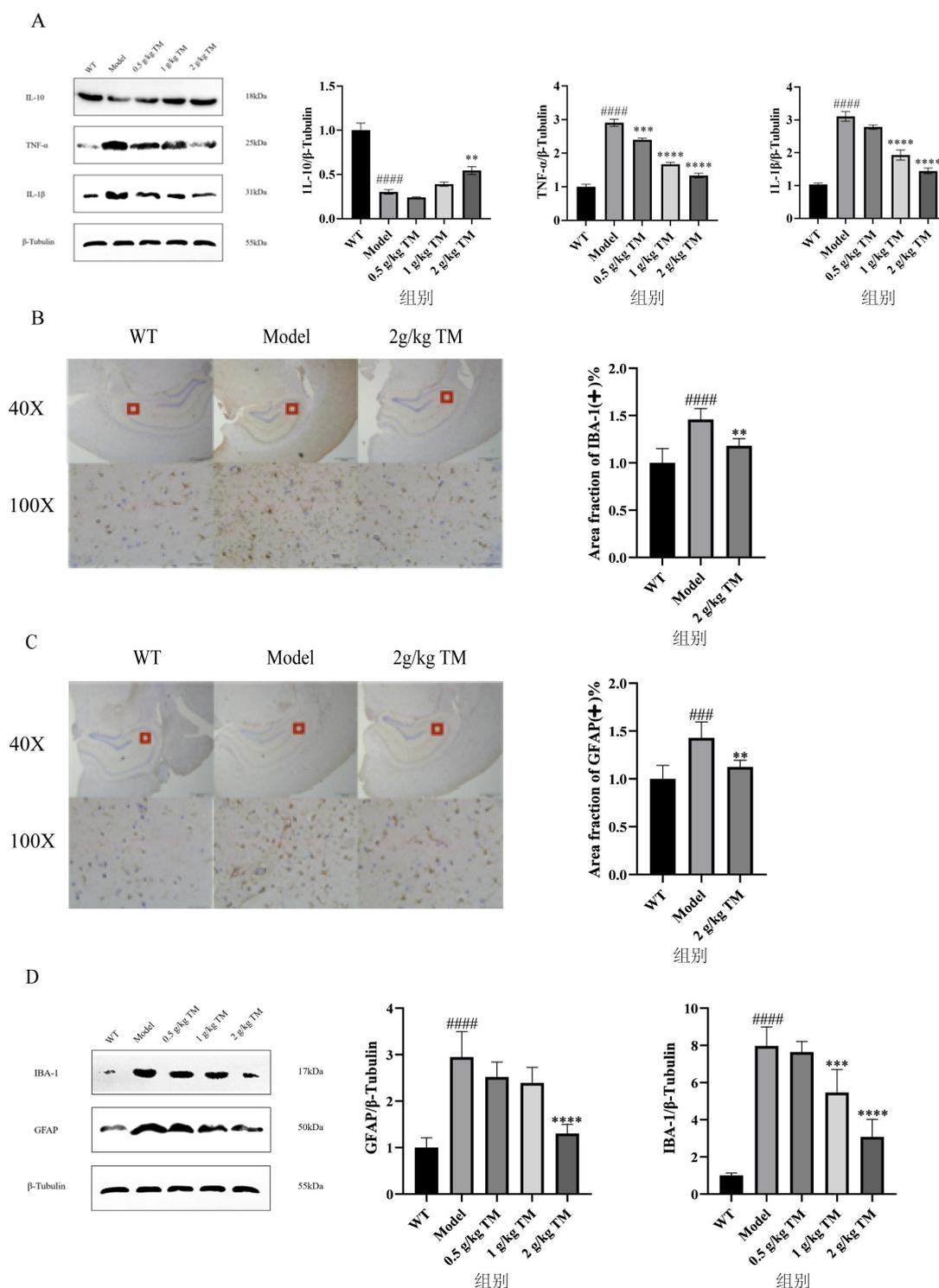


图 2 松茸提取物缓解 AD 模型小鼠海马区神经炎症

Fig.2 TM alleviates neuroinflammation in hippocampus in AD model mice

注: A 表示 IL-10、TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达水平; B 表示小鼠海马体中 IBA-1 含量 (免疫组化, 40X, 100X); C 表示小鼠海马体中 GFAP 含量 (免疫组化, 40X, 100X); D 表示 IBA-1 与 GFAP 蛋白表达量。

炎症过程在引发和传播 AD 相关病理中起着不可或缺的作用。通过 WB 检测不同处理组小鼠海马区炎症因子表达水平, 实验结果如图 2A 所示, 模型组小鼠脑部的 TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达量较 WT 组显著上调, 同时伴随着 IL-10 含量水平显著下调 ($P < 0.0001$), 而给予 TM 处理能够显著降低 AD 模型小鼠脑部海马区 TNF- α 、IL-1 β 蛋白水平, 上调 IL-10 水平, 且在实验浓度范围内 2 g/kg TM 表现出最佳治疗效果, 其中 TNF- α 与 IL-1 β 表达量分别降低了 53.98%、53.41%, 而 IL-10 表达量显著上调 80.21% ($P < 0.01$)。免疫荧光染色显示 (图 2B、2C), 与 WT 组小鼠相比, 模型组小鼠海马组织中 IBA-1 和 GFAP 的表达量明显高于对照组。经 2 g/kg TM 处理后, IBA-1 与 GFAP 表达量明显减少了 61.39%、55.82% ($P < 0.0001$)。目前的研究报告了类似结果, 显示某些提取物能够通过抑制 TNF- α 和 IL-1 β 的表达来改善 AD 相关的炎症反应^[16]。研究进一步确认了松茸提取物在抑制炎症因子方面的有效性, 特别是在提高 IL-10 水平及降低胶质细胞活化方面的潜力。

2.3 松茸提取物减轻 AD 模型小鼠的脑组织损伤

根据小鼠脑切片 HE 染色的结果 (图 3), 模型组小鼠的海马细胞显示出染色和核变异的加深, 以及正常神经元细胞数量的减少。当 2 g/kg TM 被施用于接受 A β ₄₂ 海马区注射的小鼠后, 这些指标得到改善, 正常神经元数量显著增多了 33.57% ($P < 0.01$)。说明松茸提取物减轻了 A β ₄₂ 海马区注射小鼠的脑组织损伤。研究显示, 炎症反应通过释放促炎细胞因子 (如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6) 加速神经元凋亡, 并激活凋亡信号通路。此外, 氧化应激损伤细胞膜、蛋白质和 DNA, 进一步导致神经元功能障碍。炎症还可能抑制神经保护因子的表达, 降低神经元生存能力。活化的胶质细胞释放有害物质也影响神经元存活^[17]。这些结果提示松茸提取物不仅能够减轻阿尔茨海默病模型小鼠的神经炎症, 还可能通过调节炎症微环境来改善神经功能。

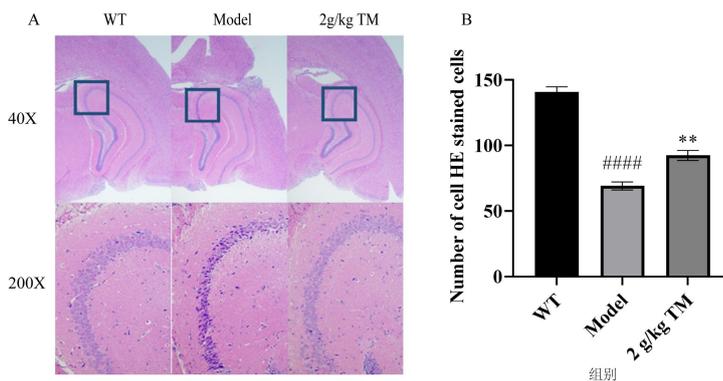


图3 松茸提取物改善 AD 模型小鼠脑组织损伤

Fig.3 TM alleviates brain tissue damage in AD model mice

注: A 表示 HE 染色结果; B 表示神经细胞数量定量分析。

2.4 松茸提取物减轻 AD 模型小鼠的氧化应激水平

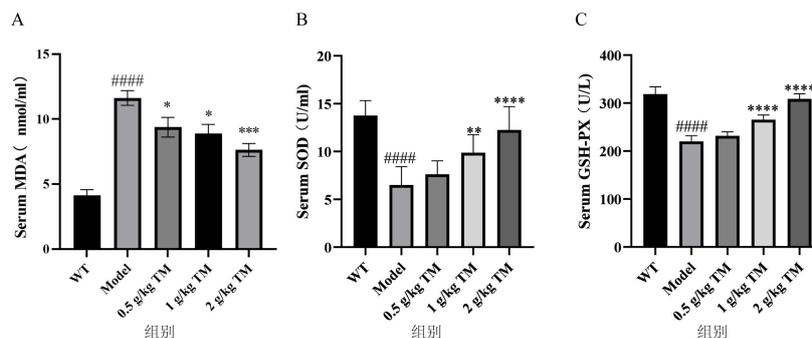


图4 松茸提取物缓解 AD 模型小鼠氧化应激失衡水平

Fig.4 TM alleviates oxidative stress in AD model mice

注: A 表示 MDA (丙二醛) 水平; B 表示 SOD (超氧化物歧化酶) 水平; C 表示 GSH-PX (谷胱甘肽过氧化物酶) 水平。

免疫细胞的活化和细胞因子的释放会导致细胞内外氧化应激的增加。氧化应激和神经炎症之间的持续联系形成恶性循环,共同推动 AD 的病理进展。评估了松茸提取物对 AD 模型小鼠血清中抗氧化应激标志物的影响,结果如图 4 所示。与 WT 组小鼠相比,模型组小鼠 MDA 水平升高(图 4A, $P<0.0001$),而 SOD 和 GSH 的含量显著降低(图 4B、4C, $P<0.0001$)。与模型组相比,2 g/kg TM 处理组可显著增加 AD 小鼠脑中抗氧化剂 SOD、GSH 含量($P<0.0001$)。Nam 等^[17]发现桔梗根提取物可以缓解氧化应激和神经炎症,通过打破这种恶性循环来减轻 $A\beta$ 沉积和神经退化。结合上述试验结果,说明 TM 不仅能够减轻 AD 模型小鼠的神经炎症,还可能通过调节炎症微环境和改善抗氧化状态来减轻 AD 的病理进展。

2.4 松茸提取物调节 AD 模型小鼠肠道菌群多样性

2.4.1 Alpha 多样性分析

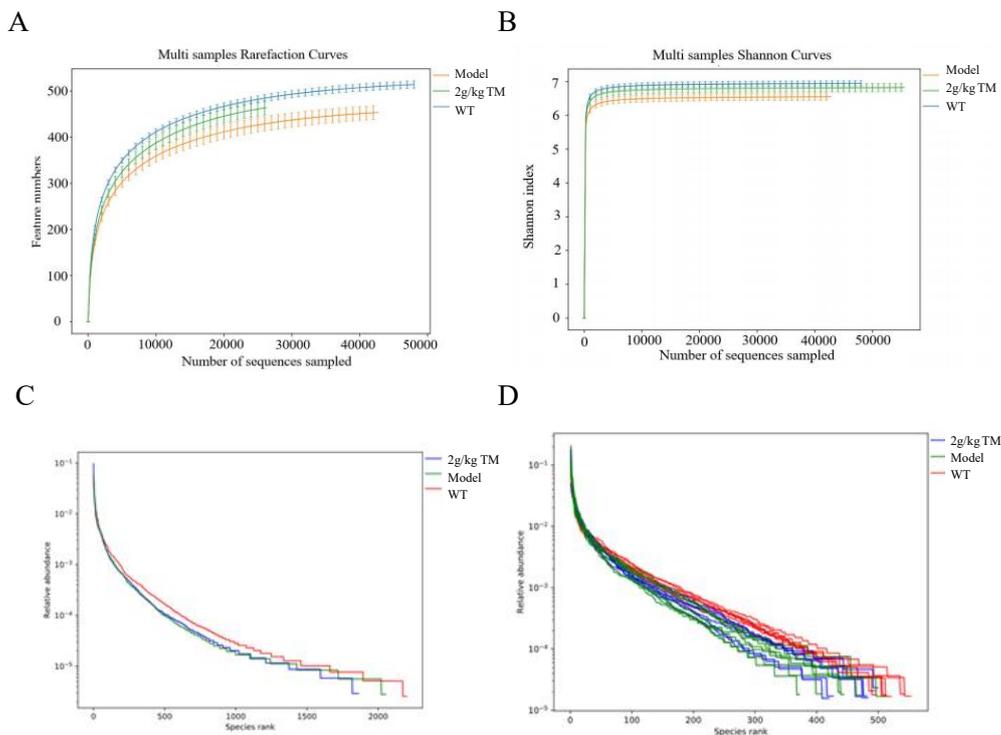


图 5 Alpha 多样性分析

Fig.5 Alpha diversity analysis

注: A 表示样品稀释曲线; B 表示 Shannon index 稀释曲线; C 表示各组的 Rank Abundance 曲线; D 表示样品的 Rank Abundance 曲线。

新出现的证据表明,肠道菌群微生物失调是加速 AD 进程的重要原因之一^[18]。肠道微生物群组成的改变可诱导肠道屏障通透性增加和免疫激活,导致全身炎症,进而损害血脑屏障,促进神经炎症、神经损伤,最终导致神经退行性变。Alpha 多样性是评估肠道菌群是否健康的重要指标^[19,20]。研究使用物种累积曲线和等级聚类曲线来评估肠道菌群的多样性(图 5A)。模型组小鼠肠道微生物群的可操作分类单元(OTU)低于 WT 组小鼠,这表明在脑内注射 $A\beta_{42}$ 蛋白后,模型组小鼠肠道微生物群的多样性降低。经 2 g/kg TM 处理后,OTU 总数恢复至与 WT 组相似水平,表明 TM 能增加 AD 模型小鼠肠道微生物群的丰富度。进一步的 Shannon 分析显示,随着测序数量的增加模型小鼠的 Shannon 指数低于 WT 组小鼠(图 5B)。经 2 g/kg TM 处理后,该曲线与 WT 组小鼠的曲线相似,这证明 TM 改善了 AD 模型小鼠肠道微生物群的 Alpha 多样性。图 5C、D 为等级丰度曲线,所有样本均在 200 OTU 等级后趋于平缓,表明所选样本的丰富度和均匀度基本良好。在 OTU 大于 300 后曲线逐渐平滑,说明所选样本的均匀程度合格。WT 小鼠肠道微生物群的物种丰富度明显高于模型小鼠,而添加 TM 后,物种丰富度有所增加。结合以上结果可以说明,松茸提取物可以改善 AD 模型小鼠的菌群丰富度和多样性下降的问题。

2.4.2 Beta 多样性分析

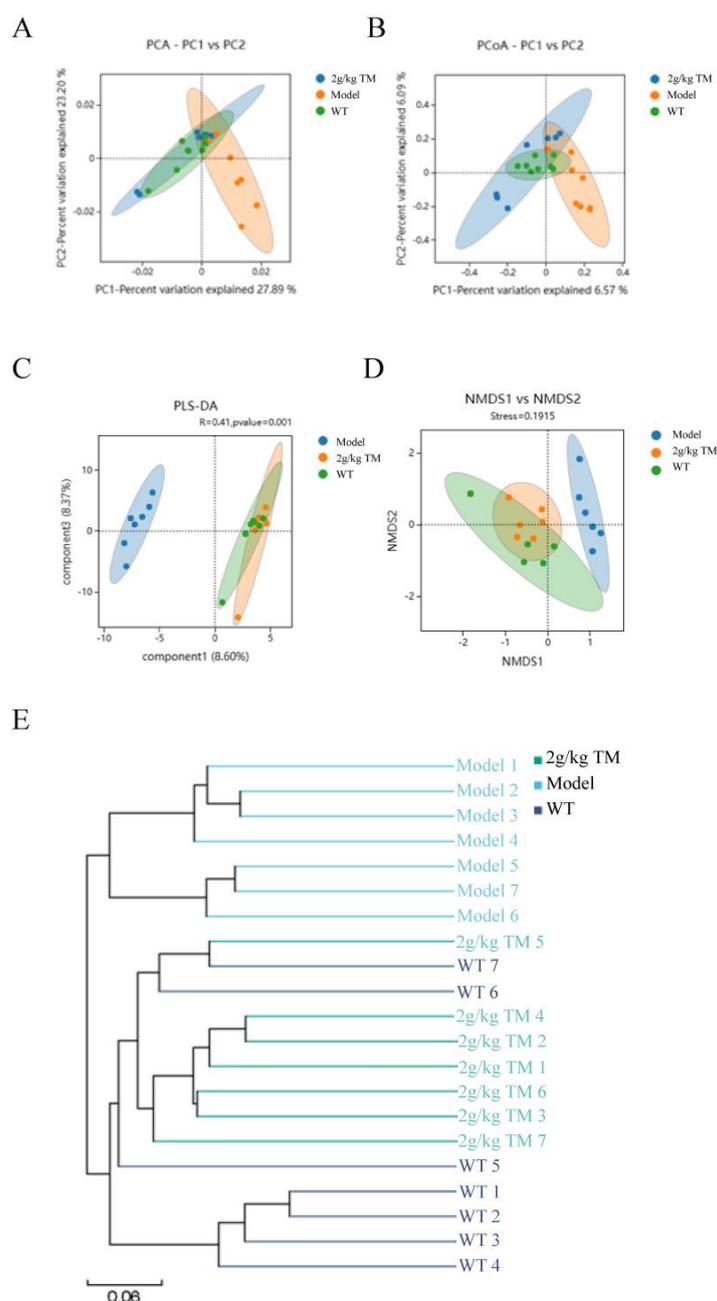


图6 Beta 多样性分析

Fig.6 Beta diversity analysis

注: A 表示 PCA 分析; B 表示 PCoA 分析; C 表示 PLS-DA 分析; D 表示 NMDS 分析; E 表示 UPGMA 聚类树。

Beta 多样性是用于衡量不同样本之间微生物群落差异程度的量化指标。它可以展示不同个体和组分微生物群落的多样性,从而揭示出它们之间的相似性和差异性。通过主成分与主坐标分析(PCA 与 PCoA)、偏最小二乘法判别分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA)和非计量多维标度(NMDS)3种 Beta 多样性指标的数据降维来研究不同个体肠道微生物群的异同^[21]。

结果如图6所示,模型组与其他两组重合度较低,表明模型组小鼠肠道菌群发生了改变;而 TM 一定程度上能恢复 AD 引起的肠道菌群的改变。

非加权组平均法(Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean, UPGMA)是一种常见的聚类分析方法,通过计算绘制出简单直观的聚类数。样品距离和聚类数长度是判断样本之间菌群相似性的重要指标^[22]。

模型组小鼠肠道微生物群的聚类树与 WT 组小鼠有显著差异(图6E)。用 2 g/kg TM 治疗后,其与 WT 组小

鼠的相似性得到改善, 这表明 TM 可以改善 AD 引起的小鼠肠道微生物群失衡。

2.4.3 松茸提取物恢复 AD 模型小鼠肠道微生物的物种变化

为了研究松茸提取物对小鼠肠道菌群的影响, 对不同门级细菌的相对丰度进行了分析。在菌门水平上, WT 小鼠、模型小鼠和治疗小鼠的肠道菌群微生物的相对丰度存在差异, 其中的优势细菌包括 Firmicutes、Bacteroidetes 和 Proteobacteria (图 7A)。与 WT 组相比, 模型组小鼠的主要肠道菌门中 Firmicutes 显著减少, Bacteroidetes、Proteobacteria 显著增加。而用 2 g/kg TM 治疗后, 这三种菌门的丰度水平得到了部分恢复, 尽管 Bacteroidetes 的变化并不显著。同时, AD 模型组小鼠的 Firmicutes/Bacteroidetes (F/B 比值) 显著下降, 通过 2 g/kg TM 干预得以恢复。Firmicutes 中的某些种类能够产生短链脂肪酸 (Short-chain Fatty Acids, SCFAs), 尤其是丁酸。丁酸对肠道健康和神经系统具有保护作用, 能够减少神经炎症和改善血脑屏障^[23]。而 Proteobacteria 的增加通常与肠道菌群失调和全身性炎症相关。F/B 比值是评估肠道菌群平衡的重要指标。低 F/B 比值与多种神经退行性疾病及免疫疾病的发生、肠道炎症反应的加剧密切相关。通过 TM 治疗恢复 F/B 比值, 提示该治疗可能通过改善肠道微生物的平衡来减轻 AD 相关症状。这表明, 松茸提取物可以在门水平上有效恢复 AD 小鼠肠道微生物群的失调。

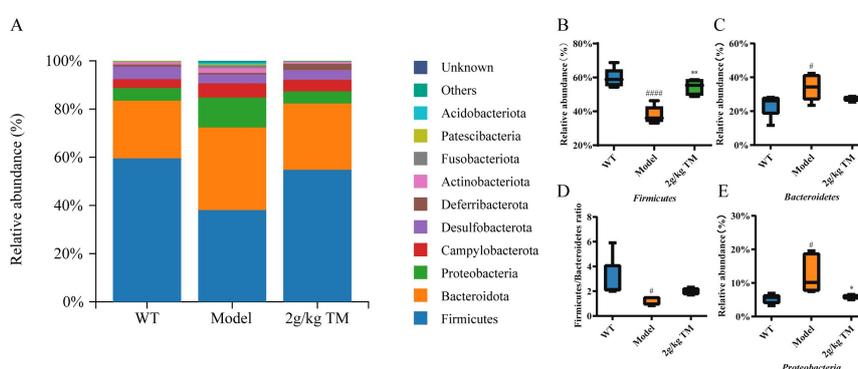


图 7 松茸提取物恢复 AD 模型小鼠门水平肠道菌群的物种变化

Fig.7 Phylum-level changes of intestinal microflora recovered by TM in AD model mice

注: A 表示门水平物种分布柱状图; B 表示不同菌门的相对丰度。

不同组小鼠肠道菌群属水平的微生物相对丰度也表现出显著差异 (图 8A)。通过 LEfSe 分析了三组中的差异细菌共鉴定出 49 个细菌分类群 (图 8B)。

进一步的 ANOVA 分析筛选了三组中 7 个显著变化的细菌属 (图 9A~G)。相对于 WT 组, 模型组 *Lachnospiraceae*、*Lactobacillus*、*Prevotellaceae* 相对丰度下降, *Muribaculaceae*、*Marvinbryantia*、*Parabacteroides*、*Helicobacter* 相对丰度上升。其中, *Helicobacter* 主要影响胃肠道的健康, 通过引发慢性炎症、破坏胃黏膜等影响肠道免疫系统。这表明小鼠的 AD 病理可能导致肠道微生物群向与炎症性疾病相关的状态转变。*Lachnospiraceae*、*Lactobacillus*、*Prevotellaceae* 能够产生 SCFA 如乙酸、戊酸等, 这些物质可以调节肠道屏障功能和免疫反应。此外, 微生物群衍生的 SCFAs 对大脑功能也可能产生显著影响, 能够调节小胶质细胞吞噬作用, 从而影响神经退行性变过程与疾病进展^[24]。代谢功能障碍在阿尔茨海默病 (AD) 的发生和发展中起着重要作用, 主要表现在淀粉样蛋白 β 的积累、神经炎症的加剧和认知功能的受损。肠道微生物群通过产生 SCFA 和胆汁酸, 调节宿主的代谢功能, 尤其是在能量稳态、脂质代谢和葡萄糖代谢中发挥关键作用^[25]。这些代谢产物不仅影响宿主的整体代谢状态, 还通过促进神经炎症, 进一步推动 AD 的病理进展。研究发现, 黄芩苷通过调节肠道微生物群和短链脂肪酸, 抑制小胶质细胞中的 cAMP-PKACREB-HDAC3 信号, 从而减少 IL-1 启动子上的 H3 乙酰化, 降低促炎因子 IL-1 的水平, 改善阿尔茨海默病患者的神经炎症和认知能力^[26]。在给予 TM 干预后, 这些菌属显示出不同程度的回调趋势, 进一步支持了 TM 在调节微生物群和减轻炎症方面的潜在作用。

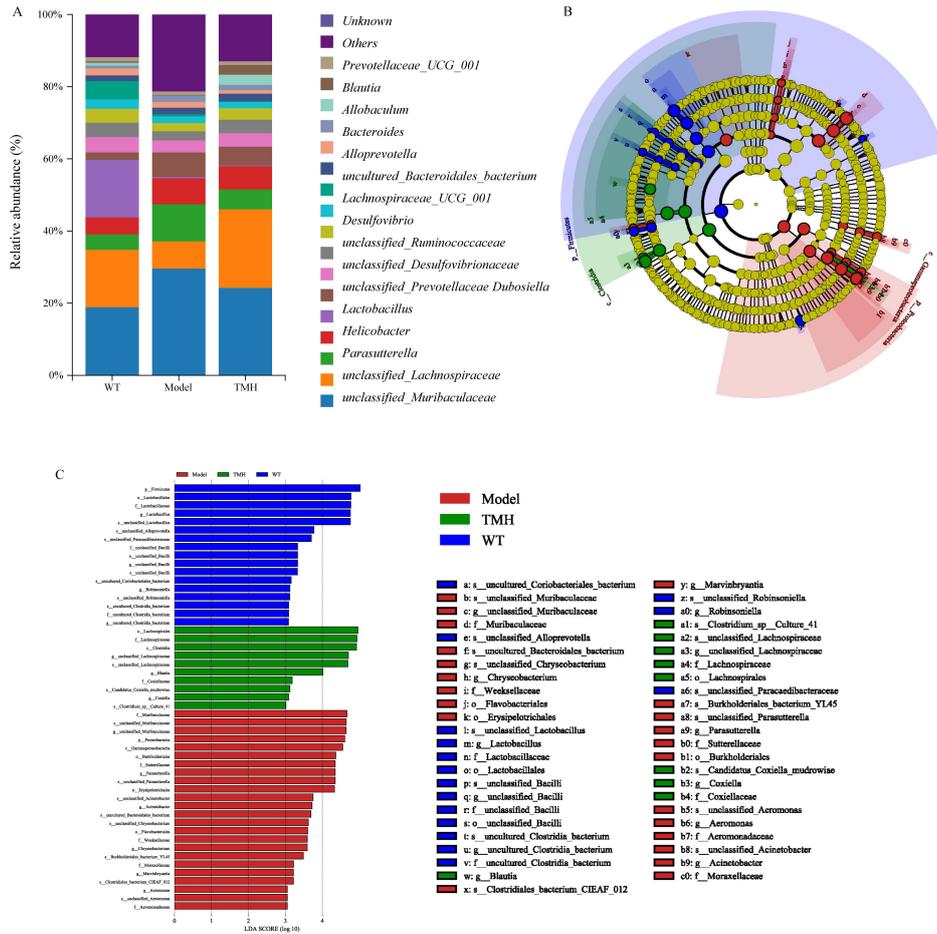


图 8 松茸提取物恢复 AD 模型小鼠属水平肠道菌群的物种变化

Fig.8 Genus-level changes of intestinal microflora recovered by TM in AD model mice

注: A 表示属水平物种分布柱状图; B 表示 LefSe 的 Cladogram 图; C 表示 LefSe 的直方图。

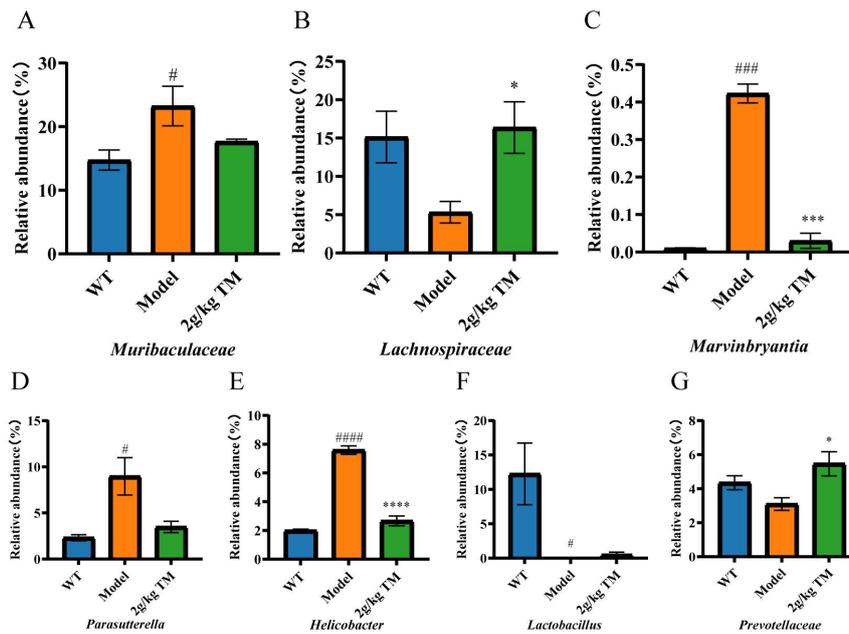


图 9 肠道菌群属水平的相对丰度

Fig.9 Relative abundance of gut microbial community members at the genus level

3 结论

本研究探讨了松茸提取物对阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 小鼠的保护机制, 采用脑注射 $A\beta_{42}$ 寡聚体建立 AD 小鼠模型, 并评估了其对于行为学、神经炎症、氧化应激和肠道菌群的影响。结果表明, 2 g/kg 的松茸提取物显著改善了 AD 小鼠的行为和认知障碍。研究发现, AD 小鼠中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 以及氧化应激标志物 MDA 水平显著升高, 而松茸提取物能够上调抗炎因子 IL-10 及抗氧化酶 SOD 和 GSH 实现有效逆转。具体而言, 与模型组相比, 炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达分别降低了 53.98% 和 53.41%, 抗氧化酶 SOD 和 GSH 的水平则显著上升了 88.46% 和 40.24%。此外, 松茸提取物显著抑制了小胶质细胞 IBA-1 和星形胶质细胞 GFAP 的活化, 其表达量分别减少了 61.39% 和 55.82%。16S rRNA 高通量测序进一步显示, 松茸提取物能够有效恢复 AD 小鼠肠道菌群在门水平和属水平上的失调, 增加了 *Lachnospiraceae*、*Lactobacillus*、*Prevotellaceae*, 这可能对肠道和大脑的健康和新陈代谢做出积极贡献。总而言之, 松茸提取物对肠道和肠道微生物群的积极影响可能是通过微生物群-肠道-大脑轴改善 AD 病理进程的潜在方法。这表明松茸提取物是值得进一步开发成 AD 药物治疗的潜在候选物。

参考文献

- [1] 王悦, 牡丹种皮提取物和 suffruticosol B 改善小鼠认知障碍作用及基于组学技术的机制探讨[D]. 北京: 北京协和医学院, 2024.
- [2] 王融, 邵祎妍, 林佳佳, 等. 肠道菌群与益生菌在衰老及其调控中的研究与应用[J]. 生命科学, 2019, 31(1): 80-86.
- [3] GONZÁLEZ-BOSCH C, BOORMAN E, ZUNSZAIN PA, et al. Short-chain fatty acids as modulators of redox signaling in health and disease [J]. Redox Biol. 2021, 47: 102165.
- [4] GUO W, LIU J, SUN J, et al. Butyrate alleviates oxidative stress by regulating NRF2 nuclear accumulation and H3K9/14 acetylation via GPR109A in bovine mammary epithelial cells and mammary glands [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2020, 152: 728-742.
- [5] 曹珊, 陈智慧, 秦静琪, 等. 中药及其有效成分治疗阿尔茨海默病研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(10): 258-268.
- [6] YANG S, REN X, SHENG J, et al. Preparation and the antitumor activity in vitro of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(3): 497-503.
- [7] LI M, GE Q, DU H, et al. *Tricholoma matsutake*-Derived Peptides Ameliorate Inflammation and Mitochondrial Dysfunction in RAW264.7 Macrophages by Modulating the NF- κ B/COX-2 Pathway [J]. Foods, 2021, 10(11): 2680.
- [8] LIU J, YANG F, CHENG M, et al. Spinal Cord Injury can be Relieved by the Polysaccharides of *Tricholoma Matsutake* by Promoting Axon Regeneration and Reducing Neuroinflammation [J]. Neuroreport. 2020, 31(14): 1024-1029.
- [9] 陈琛, 李鑫鑫, 徐尤美, 等. 天麻多糖的分离纯化与抗氧化活性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 18: 2203-2206.
- [10] HUANG C, XU D, ZHANG K, et al. A11-positive β -amyloid Oligomer Preparation and Assessment Using Dot Blotting Analysis [J]. Journal of Visualized Experiments Jove, 2018, 135: 57592.
- [11] 余虹霓, 孙梦捷, 王凤丽, 等. 地黄饮子调节 PI3K/Akt 信号通路保护 AD 小鼠脑组织星形胶质细胞损伤及糖酵解的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(8): 10-18.
- [12] GANNON O J, ROBISON L S, SALINERO A E, et al. High-fat Diet Exacerbates Cognitive Decline in Mouse Models of Alzheimer's Disease and Mixed Dementia in a Sex-dependent Manner [J]. Neuroinflammation. 2022, 19(1): 110.
- [13] MU L, XIAD, CAI J, et al. Treadmill Exercise Reduces Neuroinflammation, Glial Cell Activation and Improves Synaptic Transmission in the Prefrontal Cortex in 3 \times Tg-AD Mice [J]. International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23(20): 12655.
- [14] 杨挺, 陈馨霖, 祝小云, 等. 苦蕒睡茄内酯提取物下调 YAP 和 TGF- β /Smad 通路抑制肝星状细胞激活改善小鼠肝纤维化[J]. 药学报, 2021, 56(11): 2985-2994.
- [15] ZHAO B, ZHOU R, ZHAO Y, et al. Oxidative stress is associated with $A\beta$ accumulation in chronic sleep deprivation model [J]. Brain Research, 2024, 1829: 148776.
- [16] WANG Q, LI H, WANG FX, et al. Huannao Yicong Decoction Extract Reduces Inflammation and Cell Apoptosis in $A\beta$ -induced Alzheimer's Disease Model of Rats [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2017, 23(9): 672-680.
- [17] NAM Y, JI YJ, SHIN SJ, et al. Platycodon grandiflorum root extract inhibits $A\beta$ deposition by breaking the vicious circle linking oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2024, 177: 117090.

- [18] MOLINERO N, ANTÓN-FERNÁNDEZ A, HERNÁNDEZ F, et al. Gut Microbiota, an Additional Hallmark of Human Aging and Neurodegeneration [J]. *Neuroscience*, 2023, 518: 141-161.
- [19] WILLIS A D. Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2407.
- [20] HAGERTY SL, HUTCHISON KE, LOWRY CA, et al. An empirically derived method for measuring human gut microbiome alpha diversity: Demonstrated utility in predicting health-related outcomes among a human clinical sample [J]. *PloS One*, 2020, 15(3): e0229204.
- [21] DUBOIS P C, TTYNKA G, FRANKE L, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression [J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(4): 295-302.
- [22] MOULTON V, SPILLNER A, WU T. UPGMA and the normalized equidistant minimum evolution problem [J]. *Theoretical Computer Science*, 2017, 721: 1-15.
- [23] BAYAZID AB, LIM BO. Therapeutic Effects of Plant Anthocyanin against Alzheimer's Disease and Modulate Gut Health, Short-Chain Fatty Acids [J]. *Nutrients*, 2024, 16(11): 1554.
- [24] ERNY D, DOKALIS N, MEZŐ C, et al. Microbiota-derived Acetate Enables the Metabolic Fitness of the Brain Innate Immune System During Health and Disease [J]. *Cell Metab*. 2021, 33(11): 2260-2276.
- [25] WU S, WU Q, WANG J, et al. Novel Selenium Peptides Obtained from Selenium-Enriched *Cordyceps Militaris* Alleviate Neuroinflammation and Gut Microbiota Dysbacteriosis in LPS-Injured Mice [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(10): 3194-3206.
- [26] ZHANG, S., WEI, D., LV, S., et al. Scutellarin Modulates the Microbiota-Gut-Brain Axis and Improves Cognitive Impairment in APP/PS1 Mice [J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2022, 89: 955-975.