

研究报告

运动通过微生物-肠-脑轴调控 NF- κ B/NLRP3 通路抑制细胞焦亡改善肥胖相关认知障碍雷森林¹, 谌晓安¹, 宋为正¹, 李先辉², 王兆锋^{*3}

1 吉首大学 体育科学学院, 湖南 吉首 416000

2 吉首大学医学院, 湖南 吉首 416000

3 北部湾大学 体育学院, 广西 钦州 535011

雷森林, 谌晓安, 宋为正, 李先辉, 王兆锋. 运动通过微生物-肠-脑轴调控 NF- κ B/NLRP3 通路抑制细胞焦亡改善肥胖相关认知障碍[J]. 微生物学通报, 2025, 52(7): 3222-3244.

LEI Senlin, CHEN Xiao'an, SONG Weizheng, LI Xianhui, WANG Zhaofeng. Exercise regulates the NF- κ B/NLRP3 pathway via the microbiota-gut-brain axis to inhibit pyroptosis and ameliorate obesity-related cognitive impairment[J]. Microbiology China, 2025, 52(7): 3222-3244.

摘要: 【背景】肥胖相关认知障碍与肠道微生态稳态失调密切相关, 运动可通过微生物-肠-脑轴抑制细胞焦亡, 从而防治肥胖相关认知障碍。【目的】基于肠道菌群和核因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)/核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白 3 (nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3, NLRP3)细胞焦亡通路, 探究运动通过微生物-肠-脑轴改善高脂饮食诱导肥胖相关认知障碍的作用机制。【方法】无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组(CON, $n=11$)和肥胖模型组($n=29$), 于 12 周后筛选肥胖认知障碍小鼠, 随机分为高脂喂养组(high-fat diet, HFD)和高脂喂养+运动组(AE), 随后 8 周 AE 组进行运动干预(12 m/min, 6 次/周), 其余组静态笼饲养。采用新物体识别(novel object recognition, NOR)和 Y 迷宫测试检验小鼠的认知功能, 采用生物试剂盒检测血脂及肝功能指标变化, 利用 ELISA 检测肠道内容物及血清脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)水平; 采用苏木精-伊红染色(hematoxylin and eosin staining)观察肝脏、海马、结肠组织细胞形态, 采用 Western blotting 检测海马组织中炎症、细胞焦亡及突触可塑性相关蛋白变化, 16S rRNA 基因测序检测肠道菌群组成。【结果】相较于 CON 组, HFD 组小鼠体重、Lee 指数、体重指数(body mass index, BMI)及肝脏脂肪变性面积显著增加($P<0.05$), 血脂异常, 肝功能损伤($P<0.05$); 海马 CA1、CA3 及 DG 区神经元数量显著减少($P<0.01$), 锥体细胞排列松散、核固缩; 学习记忆能力显著下降($P<0.01$); 相较于 HFD 组, AE 组小鼠生理指标、血脂、肝功能相关指标及肝脂肪变性显著改善($P<0.05$), 海马神经元密度恢复, 学习记忆能力显著改善($P<0.01$)。

资助项目: 国家自然科学基金(81860636)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81860636).

*Corresponding author. E-mail: 110078015@qq.com

Received: 2025-04-30; Accepted: 2025-05-22; Published online: 2025-06-05

相较于 CON 组, HFD 组肠道菌群 α 和 β 多样性发生显著变化($P<0.05$), 厚壁菌门(*Firmicutes*)/拟杆菌门(*Bacteroidota*)比值极显著增加($P<0.01$), 显著富集粪小杆菌属(*Faecalibaculum*), 并且大肠杆菌志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)相对丰度显著增加($P<0.05$); 相较于 HFD 组, AE 组 α 和 β 多样性无显著差异($P>0.05$), *Firmicutes/Bacteroidota* 比值极显著降低($P<0.01$), *Escherichia-Shigella* 相对丰度显著降低($P<0.05$), 相关性分析发现 *Escherichia-Shigella* 与 LPS、白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)和 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)呈显著正相关($P<0.05$), 与突触素 1 (synapsin 1, SYN1)呈显著负相关($P<0.05$)。相较于 CON 组, HFD 组肠道通透性增加, 组织病理评分显著增加($P<0.01$), 紧密连接蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1)表达显著降低($P<0.01$), 粪便和血清 LPS 显著增加, 运动能显著改善上述指标的变化($P<0.05$)。相较于 CON 组, HFD 组海马组织中炎症相关蛋白 TLR4、NF- κ B, 以及细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、cleaved-caspase1、气道蛋白 D (gasdermin D, GSDMD)、IL-1 β 表达水平显著上调($P<0.05$), 突触可塑性相关蛋白鸢尾素(irisin)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、突触生长蛋白(synaptophysin, SYP)、SYN1 显著降低($P<0.05$), 运动能够抑制炎症、细胞焦亡相关蛋白表达, 促进突触可塑性相关蛋白表达($P<0.05$)。

【结论】运动通过调节肠道微环境, 抑制高脂饮食诱导的 *Escherichia-Shigella* 过度生长, 减少 LPS 的产生和释放并增强肠道屏障功能, 继而通过微生物-肠-脑轴抑制 NF- κ B/NLRP3 通路减轻细胞焦亡, 下调炎症因子 IL-1 β 表达, 防治肥胖相关认知障碍。

关键词: 高脂饮食; 运动; 认知功能障碍; 微生物-肠-脑轴; 细胞焦亡

Exercise regulates the NF- κ B/NLRP3 pathway via the microbiota-gut-brain axis to inhibit pyroptosis and ameliorate obesity-related cognitive impairment

LEI Senlin¹, CHEN Xiao'an¹, SONG Weizheng¹, LI Xianhui², WANG Zhaofeng^{*3}

1 School of Physical Education, Jishou University, Jishou 416000, Hunan, China

2 Jishou University School of Medicine, Jishou 416000, Hunan, China

3 School of Physical Education, Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, Guangxi, China

Abstract: [Background] Obesity-related cognitive impairment is closely related to the disruption of gut microbiota homeostasis. Exercise can prevent and treat obesity-related cognitive impairment by inhibiting pyroptosis via the microbiota-gut-brain axis. **[Objective]** To explore the mechanism by which exercise ameliorates obesity-related cognitive impairment induced by a high-fat diet via the microbiota-gut-brain axis based on the gut microbiota and the nuclear factor (NF)- κ B/nucleotide binding oligomerization domain like protein receptor 3 (NLRP3) pathway-mediated pyroptosis. **[Methods]** Male C57BL/6 mice of SPF grade were randomly allocated into a control group (CON, $n=11$) and an obesity modeling group ($n=29$). After 12 weeks, mice with obesity-related cognitive impairment were selected and randomly assigned into a high-fat diet (HFD) group and a high-fat diet plus exercise (AE) group. In the following 8 weeks, the AE group underwent exercise intervention (12 m/min, 6 times per week), while the other groups were kept in static cages. The

cognitive function of the mice was tested by NOR and Y-maze tests. Biochemical kits were used to measure changes in blood lipid and liver function indicators. ELISA was employed to measure lipopolysaccharide (LPS) levels in the intestinal contents and serum. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed to observe the cell morphology in the hepatic, hippocampal, and colonic tissue. Western blotting was employed to determine the expression levels of proteins involved in inflammation, pyroptosis, and synaptic plasticity in the hippocampus. The gut microbiota composition was analyzed by 16S rRNA gene sequencing. **[Results]** Compared with the CON group, the HFD group showed increases in body weight, Lee index, body mass index, and liver steatosis area ($P<0.05$), abnormalities in blood lipids, liver function damage ($P<0.05$), decreased number of neurons in the CA1, CA3, and DG regions of the hippocampus ($P<0.01$), loose arrangement of pyramidal cells, nuclear condensation, and declined learning and memory abilities ($P<0.01$). Compared with the HFD group, the AE group showed improvements regarding physiological indicators, blood lipids, liver function indicators, and liver steatosis ($P<0.05$), with restored density of hippocampal neurons and improved learning and memory abilities ($P<0.01$). Compared with the CON group, the HFD group exhibited changes in the α and β diversity of the gut microbiota ($P<0.05$). The *Firmicutes/Bacteroidota* ratio increased in the HFD group ($P<0.01$), with enrichment of *Faecalibaculum* and increased relative abundance of *Escherichia-Shigella* ($P<0.05$). Compared with the HFD group, the AE group showed no significant difference in α or β diversity ($P>0.05$) but decreases in the *Firmicutes/Bacteroidota* ratio ($P<0.01$) and relative abundance of *Escherichia-Shigella* ($P<0.05$). Correlation analysis showed that the relative abundance of *Escherichia-Shigella* was positively correlated with LPS, interleukin (IL)-1 β , and Toll-like receptor 4 (TLR4) ($P<0.05$) but negatively correlated with synapsin 1 (SYN1) ($P<0.05$). Compared with the CON group, the HFD group presented enhanced gut permeability, increased histopathological scores ($P<0.01$), downregulated expression of zonula occludens-1 (ZO-1) ($P<0.01$), and elevated LPS levels in the feces and serum. Exercise improved changes in the above indicators ($P<0.05$). Compared with the CON group, the HFD group showed upregulated expression of inflammation-related proteins (TLR4 and NF- κ B) and pyroptosis-related proteins (NLRP3, cleaved-caspase1, gasdermin D (GSDMD), and IL-1 β) ($P<0.05$) and downregulated expression of synaptic plasticity-related proteins [irisin, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), synaptophysin (SYP), and SYN1] ($P<0.05$) in the hippocampus. Exercise inhibited the expression of inflammation- and pyroptosis-related proteins and promoted the expression of synaptic plasticity-related proteins ($P<0.05$). **[Conclusion]** Exercise regulates the gut microenvironment by inhibiting the HFD-induced overgrowth of *Escherichia-Shigella*, reducing the production and release of LPS, and enhancing the gut barrier function. It then inhibits the NF- κ B/NLRP3 pathway via the microbiota-gut-brain axis to alleviate pyroptosis and downregulate the expression of IL-1 β , thus preventing and treating obesity-related cognitive impairment.

Keywords: high-fat diet; exercise; cognitive impairment; microbiota-gut-brain axis; pyroptosis

肥胖是由能量摄入与消耗失衡引起的代谢性病理疾病,其发生与遗传、生理行为及环境因素密切相关^[1],世界卫生组织数据显示,预

计到 2025 年全球肥胖人口将达 15.3 亿,提示肥胖给世界卫生组织系统带来沉重负担^[2]。基于多种族亚洲人群分析结果显示,肥胖与认知

功能之间存在因果关联^[3]；流行病学数据进一步表明，长期(10–14.9 年)患有肥胖症的人群罹患神经退行性疾病的风险显著增加^[4]；临床影像学揭示^[5]，肥胖患者脑组织呈现灰质萎缩、白质纤维完整性受损等病理性恶化，说明肥胖能够直接影响中枢神经系统(central nervous system, CNS)功能，导致认知功能障碍^[6]。改善肥胖已经成为防治认知障碍相关神经退行性疾病的重要举措。

肠道微生物作为宿主肠道稳态和免疫系统的重要生物调节器，可通过微生物-肠-脑轴参与肥胖相关认知障碍进程^[7]。菌群移植实验证实，携带肥胖型小鼠菌群的健康小鼠会出现血脑屏障功能障碍、脑血流量降低及认知行为恶化^[8]。肥胖模型研究进一步指出，高脂饮食会诱导肠道菌群失调，致使紧密连接蛋白表达下调并增加屏障通透性^[9]，进而促使脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等细菌代谢产物发生易位，神经中枢大量累积的 LPS 继而通过激活小胶质细胞活化、增加 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4)/核因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)信号通路表达等机制诱发神经炎症，导致白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、IL-18 等炎症因子大量分泌，造成神经中枢受损^[10]。此外，持续活化 NF- κ B 炎症信号通路过程中还会促进核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白 3 (nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3, NLRP3)介导的细胞焦亡发生，进一步导致神经元丢失和突触可塑性受损，从而影响学习和记忆功能^[11]。因此，通过维持肠道菌群稳态，靶向调控 LPS 介导的 NF- κ B/NLRP3 通路减轻细胞焦亡发生，是防治肥胖相关认知障碍的有效途径。

久坐不动的不良生活方式是导致肥胖的重要诱因之一，运动作为一种非药物减脂疗法，在治疗肥胖的同时也对认知障碍具有积极改善作用。基于群体轨迹模型对 7 392 名中老年人身体活动与肥胖指数分析发现，肥胖[体重指数(body mass index, BMI) ≥ 28 kg/m²]与认知能力降低相

关，其中体育活动起到 5.94%的中介作用^[12]。既往研究指出，运动能够通过激活 irisin/脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)信号通路改善前额叶皮质损伤^[13]，提高海马神经元轴突长度、树突复杂性、树突棘数量增强神经发生和神经元结构可塑性^[14]，降低海马胰岛素抵抗，减轻海马炎症反应^[15]等机制延缓肥胖相关认知障碍。尽管新近研究^[16]指出运动能够重塑高脂饮食诱导肥胖小鼠的肠道菌群组成，并通过调节脂质代谢减轻肥胖，但运动对肠道微生态环境的调节作用是否能够通过肠-脑轴影响认知功能，目前尚无确切报道。因此，基于理论，本研究旨在探索运动是否通过微生物-肠-脑轴调控 NF- κ B/NLRP3 通路，从而抑制细胞焦亡发挥神经保护作用，为临床应用运动治疗肥胖相关认知障碍提供更多证据。

1 材料与方法

1.1 样品

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级健康雄性 C57BL/6 小鼠，湖南斯莱克景达实验动物有限公司，体重约为(17.92 $\pm$ 0.57) g。所有小鼠于标准环境中饲养[温度(23 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C，湿度(55 $\pm$ 5)%，12 h 光暗循环]，自由摄食饮水，垫料每周更换 2 次。动物实验方案遵循动物研究“3R(替代、减少、优化)原则”，并经吉首大学生物医学伦理委员会批准(审批号：2024-0126)。

1.2 主要试剂和仪器

普通饲料和高脂饲料，北京博爱港生物技术有限公司；放射免疫沉淀分析缓冲液(radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA)强裂解液和苯甲磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)蛋白酶抑制剂，含吐温-20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline with tween-20, TBLS)、增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)超敏显影液，碧云天生物技术有限公司；丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate

aminotransferase, AST)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)微板法检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所有限公司; 紧密连接蛋白1(zonula occludens-1, ZO-1)、气道蛋白D(gasdermin D, GSDMD)、IL-1 β 、cleaved-caspase1和NF- κ B兔源一抗, 武汉三鹰生物技术有限公司; Irisin、突触生长蛋白(synaptophysin, SYP)、突触素1(synapsin 1, SYN1)、NLRP3、 β -actin、tubulin兔源一抗和羊抗兔二抗, 成都正能生物技术有限公司; TLR4抗体, 湖南欧迈科博生物技术有限公司; BDNF抗体, Abcam生物技术有限公司; 10% PAGE凝胶制备试剂盒和三色预染蛋白marker, 上海雅酶生物医药科技有限公司; H&E染色试剂盒, 武汉赛维尔生物科技有限公司; LPS的ELISA试剂盒, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 粪便DNA提取试剂盒, Omega公司。

Illumina MiSeq PE300平台, 上海美吉生物医药科技有限公司; QuantusTM荧光定量仪, Promega公司; PCR仪, ABI公司; 电泳仪, 北京六一生物技术有限公司; Y迷宫、新物体识别系统, 北京天鸣宏远科技发展有限公司; 小动物跑步机, 安徽耀坤生物技术有限公司; 超净工作台和酶标仪, 赛默飞世尔科技公司; 高速离心机, Eppendorf公司; 多样品组织研磨机, 上海净信实业发展有限公司; 电泳仪和转膜仪, Bio-Rad公司; 化学发光成像仪, 北京赛智创业科技有限公司; 显微镜, 奥林巴斯有限公司; 组织包埋机和石蜡切片机, Leica公司。

1.3 肥胖认知障碍模型构建与实验设计

本研究的实验流程见图1。首先, 小鼠适应性喂养1周后构建认知障碍肥胖小鼠模型。将小鼠随机分为对照组(CON, $n=11$, 普通饲料, 脂肪供能10%)和肥胖模型组($n=29$, 高脂饲料, 脂肪供能60%)。持续喂养12周后, 以体重增加 $\geq 30\%$ 且血清TG水平显著高于CON组作为

肥胖建模成功标准^[17]。通过新物体识别(novel object recognition, NOR)和Y迷宫测试筛选出认知功能障碍的肥胖小鼠纳入研究, 剔除造模失败的小鼠。最终保留24只造模成功小鼠, 随机处死1只肥胖小鼠观察脂肪肝表型变化后, 将剩余造模成功小鼠($n=23$)随机分为高脂喂养组(high-fat diet, HFD) ($n=11$)、HFD+运动组(AE, $n=12$), 仅AE组小鼠进行运动干预。AE组小鼠在倾斜度为0°的6车道跑步机上(52 cm $\times$ 9 cm $\times$ 18 cm)进行有氧运动干预(图2A), 运动方案基于参考文献[18]制定: 第1周进行适应性训练(5 m/min, 30 min/d), 第2–8周正式训练包括5 min热身(9 m/min)、50 min主运动(12 m/min)及5 min冷身(9 m/min), 每周6次。HFD组和CON组小鼠每日置于跑台相同时长以排除环境因素干扰。最终CON组、AE组和HFD组各保留10只小鼠进入后续分析(剔除标准: 运动损伤、拒跑或体重异常下降)。在20周干预结束后第21周进行小鼠认知行为学测试, 随后进行组织取材。

1.4 NOR和Y迷宫测试

分别于造模结束(第12周)和运动干预后(第21周)进行NOR和Y迷宫实验, 以评估各组小鼠认知功能的变化。NOR实验可用于评价小鼠记忆能力的行为测试。实验主要分为3个阶段: 适应阶段: 将小鼠置于实验箱自由探索10 min; 训练阶段: 在测试箱A中对角放置2个相同的物体, 将小鼠放入2个物体中间自由探索10 min; 测试阶段: 训练期结束后24 h, 将其中1个物体替换为大小相似、颜色和形状易于区分的新物体B, 将小鼠放入2个物体中间自由探索5 min。采用Xeye Aba V3.2动物行为分析系统记录小鼠旧物体探索时间 T_A 、新物体探索时间 T_B , 计算识别指数和偏好指数, 识别指数= $T_A/(T_A+T_B)$; 偏好指数= $(T_A-T_B)/(T_A+T_B)$ ^[19]。

采用Y迷宫实验检测各组小鼠空间记忆能力; Y迷宫行为箱由3个亚克力板(50 cm $\times$ 20 cm $\times$ 25 cm)组成, 通道夹角为120°。实验前将3个臂分别随机定义为新异臂、起始臂和熟

悉臂, 然后进行 2 个阶段测试。第 1 阶段: 关闭新异臂, 从起始臂放入小鼠, 使其自由探索 10 min。第 2 阶段: 将所有臂开放, 再使小鼠自由探索 5 min, 并记录小鼠运动轨迹、各个臂探索时间和进入次数^[20]。

1.5 生化指标分析

行为学实验后麻醉小鼠进行眼球取血, 将血液常温静置 2 h, 4 °C、1 000 r/min 离心 20 min

后取上层血清, 采用微板法对血清中肝功能指标(ALT、AST)、血脂(TG、TC、HDL-C、LDL-C)进行检测, 采用 ELISA 试剂盒检测各组小鼠血清中 LPS 含量。将小鼠断颈处死后, 使用无菌剪刀和镊子在盲肠的尖部进行横切, 将盲肠内容物轻轻挤压至提前标记好的无菌冻存管中, 采用 ELISA 试剂盒检测各组小鼠盲肠内容物中 LPS 含量。

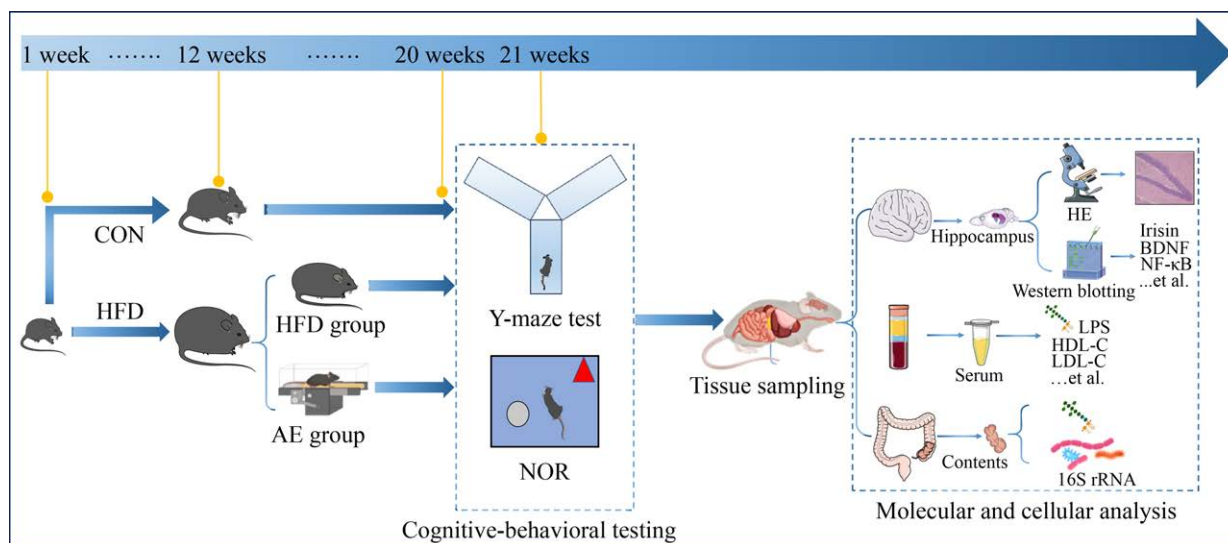
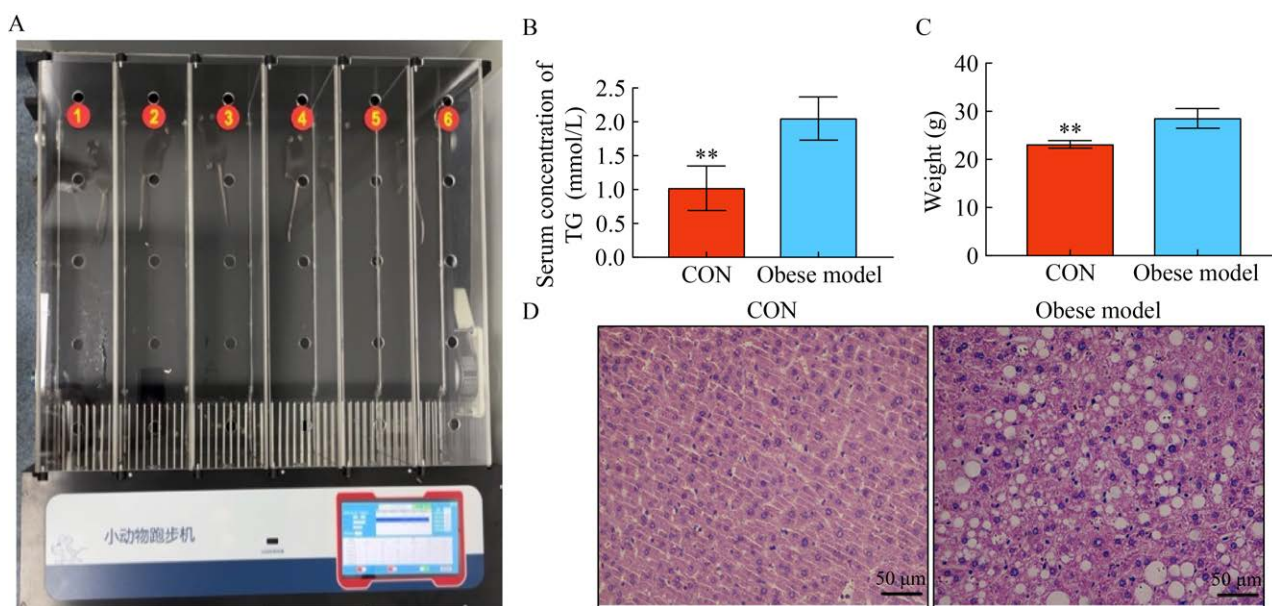


图 1 实验流程图

Figure 1 The flowchart of experiment.



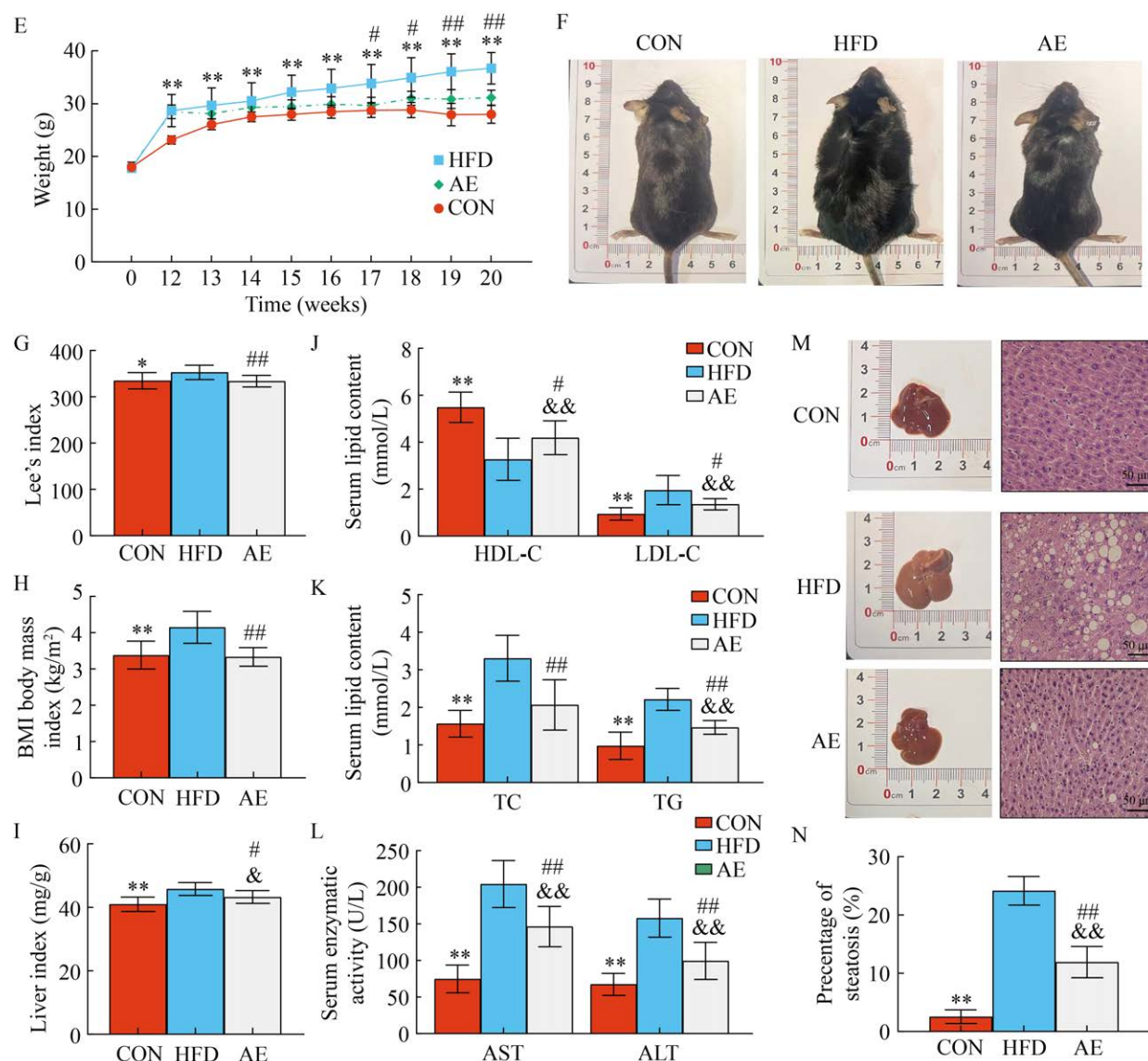


图 2 运动对肥胖相关指标的影响($n=8-10$) A: 跑步机运动; B: 体重; C: TG; D: 肝脏 H&E 染色结果(标尺为 $50\ \mu\text{m}$); E: 第 12–20 周小鼠体重变化; F: 各组小鼠体型比较; G: Lee 指数; H: BMI; I: 肝脏指数; J: HDL-C、LDL-C; K: TC、TG; L: 肝功能指标 AST、ALT; M: 跑台运动对肝脏 H&E 染色结果(标尺为 $50\ \mu\text{m}$); N: Image J 软件分析脂肪变性面积百分比。*: HFD vs. CON 有显著性差异(*: $P<0.05$; **: $P<0.01$); #: HFD vs. AE 有显著性差异(#: $P<0.05$; ##: $P<0.01$); &: AE vs. CON 有显著性差异(&: $P<0.05$; &&: $P<0.01$)。下同。

Figure 2 Effects of exercise on obesity-related indicators ($n=8-10$). A: Treadmill exercise; B: Body weight; C: TG; D: Liver H&E staining results (scale bar= $50\ \mu\text{m}$). E: Body weight changes in mice from weeks 12 to 20; F: Comparison of body types among different groups of mice; G: Lee index; H: BMI; I: Liver index; J: HDL-C, LDL-C; K: TC, TG; L: Liver function index AST, ALT; M: Effects of treadmill exercise on liver H&E staining results (scale bar= $50\ \mu\text{m}$); N: Analysis of the percentage of fatty degeneration area using Image J software. *: Significant differences between HFD and CON (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$); #: Significant differences between HFD and AE (#: $P<0.05$; ##: $P<0.01$); &: Significant differences between AE and CON (&: $P<0.05$; &&: $P<0.01$). The same below.

1.6 组织苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, H&E)染色

将小鼠取血后断颈处死, 每组随机取 3 只小鼠, 迅速分离出肝脏、全脑和结肠组织, 并分别置于 4%多聚甲醛溶液中固定, 石蜡包埋后切片, 使用二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 采用 H&E 进行染色, 而后放置于梯度乙醇溶液进行脱水处理并用中性树胶封片, 使用显微镜进行图像观察、拍照和采集。对结肠组织 H&E 染色结果进行组织学评分^[21]: (1) 肠上皮细胞: 形态正常, 0 分; 杯状细胞丢失, 1 分; 杯状细胞大面积丢失, 2 分; 隐窝丢失, 3 分; 隐窝大面积丢失, 4 分。(2) 炎症浸润: 无炎症浸润, 0 分; 浸润黏膜层, 1 分; 浸润黏膜肌层, 2 分; 广泛浸润黏膜肌层, 并伴随黏膜肌层肿胀, 3 分; 浸润黏膜下层, 4 分。

1.7 肠道微生物群测序和生物学信息分析

对收集的盲肠内容物进行全长 16S rRNA 基因高通量测序分析, 分析肠道菌群组成。采用粪便 DNA 提取试剂盒提取盲肠内容物 DNA。以 338F (5'-ACTCCTACGGGA GGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[22] 为引物扩增 16S rRNA 基因 V3-V4 区。PCR 反应体系: 5×TransStart FastPfu 缓冲液 4 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, 上游引物(5 μ mol/L) 0.8 μ L, 下游引物(5 μ mol/L) 0.8 μ L, TransStart FastPfu DNA 聚合酶 0.4 μ L, 模板 DNA 10 ng, ddH₂O 补足 20 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 27 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。每个样本设 3 个重复。将同一样本的 PCR 产物混合, 通过 2%琼脂糖凝胶回收并纯化。利用 2%琼脂糖凝胶电泳检测片段大小, 并用 QuantusTM 荧光定量仪进行定量分析。采用 Illumina MiSeq PE300 平台在上海美吉生物科技有限公司进行测序。使用 QIIME 1.9.1 识别 OTU, 序列相似性截断值为 97%, 随后采用 RDP Classifier 算法进行分类分析, 设置置信度阈值为 0.7。采用 Majorbio 云平台(<https://cloud.majorbio.com>)

进行测序后数据处理和生物信息学分析。原始测序读长存入 NCBI 序列读档库(sequence read archive, SRA)数据库(访问编号: SRP555980)。采用 Mothur 软件 (<http://www.mothur.org/wiki/Calculators>, v1.30.2)计算 α 多样性指数, 采用基于 bray-curtis 距离算法的加权 UniFrac 主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)和非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)评估肠道菌群结构相似性。使用线性判别分析效应量分析工具[linear discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe] (LDA 评分>3, $P<0.05$) 鉴定不同组间从门水平到属水平丰度差异显著的肠道菌群, 并采用 Wilcoxon 秩和检验对筛选出的富集菌属进行组间差异分析。

1.8 Western blotting 检测

将小鼠断颈处死后迅速分离两侧海马, 置于-80 $^{\circ}$ C用作后续实验。将海马组织称重后按每 10 mg 组织加入 100 μ L 强裂解液, 用多组织研磨机充分匀浆(60 Hz, 1 min), 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min 取上清。在完成双缩脲比色法(bicinchoninic acid assay, BCA)蛋白定量后, 将蛋白与十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液混合, 并进行加热变性处理。依次上样、10%分离胶电泳(浓缩胶 80 V, 20 min; 分离胶 100 V, 70 min)、湿转转膜(200 V, 70 min); 室温下封闭 1 h 后, 孵育一抗 4 $^{\circ}$ C过夜后 TBST 室温洗膜 3 次, 每次 10 min。室温下加入二抗孵育 1 h, TBST 室温洗膜 3 次, 每次 10 min。滴加 ECL 超敏显影液, 采用化学发光成像仪曝光并拍摄条带, 采用 Image J 软件计算条带灰度值。抗体基本信息见表 1。

1.9 统计分析

实验结果的数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示, 使用 Image J 以及 GraphPad Prism 8.0 作图, 并采用 SPSS 22.0 对实验数据进行统计分析。数据经方差齐性检验后, 在单变量分析中采用 t 检

表 1 抗体基本信息

Table 1 Basic antibody information

Antibody name	Antibody company	Dilution ratio
IL-1 β	武汉三鹰生物技术有限公司 Proteintech Group, Inc.	1:1 000
NLRP3	湖南欧迈科博生物技术有限公司 OMICSAB Group, Inc.	1:1 000
Cleaved-caspase1	武汉三鹰生物技术有限公司 Proteintech Group, Inc.	1:2 500
NF- κ B	武汉三鹰生物技术有限公司 Proteintech Group, Inc.	1:2 500
ZO-1	武汉三鹰生物技术有限公司 Proteintech Group, Inc.	1:5 000
TLR4	湖南欧迈科博生物技术有限公司 OMICSAB Group, Inc.	1:1 000
GSDMD	武汉三鹰生物技术有限公司 Proteintech Group, Inc.	1:1 000
Irisin	成都正能生物技术有限责任公司 ZEN-BIOSCIENCE	1:1 000
BDNF	Abcam 公司 Abcam Plc	1:1 000
SYN1	成都正能生物技术有限责任公司 ZEN-BIOSCIENCE	1:1 000
SYP	成都正能生物技术有限责任公司 ZEN-BIOSCIENCE	1:1 000
β -actin	成都正能生物技术有限责任公司 ZEN-BIOSCIENCE	1:5 000
Tubulin	成都正能生物技术有限责任公司 ZEN-BIOSCIENCE	1:5 000
Secondary antibody (goat anti-rabbit IgG)	武汉三鹰生物技术有限公司 Proteintech Group, Inc.	1:5 000

验进行两两组间比较分析；采用单因素方差分析(one-way ANOVA)用于多组间比较。

2 结果与分析

2.1 运动对肥胖相关指标的影响

高脂饮食喂养 12 周后，肥胖模型组 24 只小鼠的平均体重为 (28.55 ± 2.05) g、TG 为 (2.04 ± 0.32) mmol/L，显著高于 CON 组的 (23.13 ± 0.79) g 和 (1.01 ± 0.33) mmol/L ($P < 0.01$) (图 2B、2C)。随机处死 1 只肥胖小鼠后发现模型组脂肪肝形成(图 2D)，进一步证实肥胖模型制备成功，成功率为 82.8%。经过 8 周运动干预发现，第 17 周时，AE 组的体重显著低于 HFD 组($P = 0.028$ 1)，第 19 周($P = 0.003$ 3)和第 20 周($P = 0.000$ 4)降低效果达到极显著水平(图 2E) ($P < 0.01$)。20 周干预后，HFD 组小鼠的体型明显比 CON 组和 AE 组更肥胖(图 2F)，HFD 组的 Lee 指数、BMI 和肝指数显著高于 CON 组。相较于 HFD 组，AE 组显著降低 Lee 指数、BMI 和肝指数(图 2G–2I)。

2.2 运动对血脂和肝功能生化指标的影响

血清血脂[HDL-C、LDL-C (图 2J)、TC、TG (图 2K)及肝功能指标(ALT、AST) (图 2L)]检

测结果显示：HFD 组 LDL-C、TC、TG、AST 及 ALT 水平显著高于 CON 组($P < 0.01$)，而 HDL-C 显著降低($P < 0.01$)，表明 HFD 组小鼠血脂紊乱及肝损伤；相较于 HFD 组，AE 组上述指标均显著改善($P < 0.05$)，但仅 TC 恢复至 CON 组相似水平($P > 0.05$)。H&E 染色结果显示：相较于 CON 组，HFD 组出现严重肝细胞变性，表现为细胞大小形态不一，部分肝细胞空泡变性，而 AE 组的脂肪肝得以缓解(图 2M)；定量分析表明，HFD 组脂肪变性面积显著高于 CON 组与 AE 组($P < 0.01$)，AE 组显著高于 CON 组($P < 0.01$) (图 2N)。

2.3 运动对认知行为和海马形态的影响

本研究通过 Y 迷宫及 NOR 测试分析小鼠第 12 周(造模后)及第 20 周(干预后)学习记忆能力变化。Y 迷宫测试轨迹图(图 3A)结果显示：造模 12 周后，模型组小鼠进入新臂时间显著缩短($P < 0.05$) (图 3B)；20 周时 HFD 组进入新臂时间进一步显著缩短($P < 0.01$)，而 AE 组显著延长($P = 0.028$ 2) (图 3C)。NOR 实验示意图见图 3D，建模 12 周后，肥胖模型组小鼠识别指数($P = 0.012$)及偏好指数($P = 0.000$ 9)均显著低于 CON 组(图 3E、图 3F)；至 20 周时，HFD 组识别指数及偏好指数较 CON 组显著降低，而 AE 组识别指数及偏好指数较 HFD 组显著升高(图 3G、图 3H)。海马组

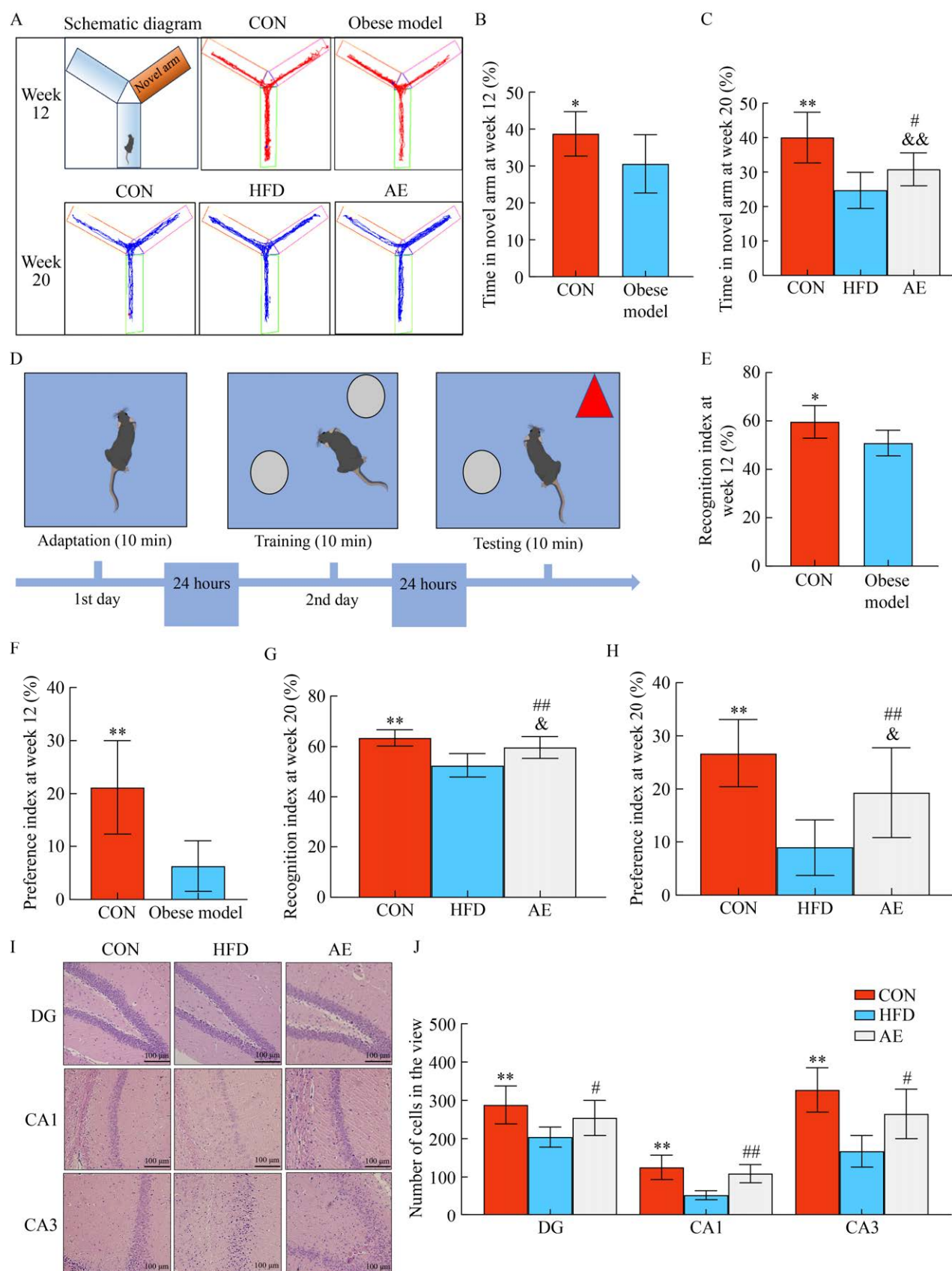


图3 运动对认知行为学测试和海马形态的影响($n=6-10$) A: Y 迷宫测试的运动轨迹图; B: 12 周新异臂探索时间; C: 20 周新异臂探索时间; D: 新物体识别实验示意图; E: 12 周新物体识别指数; F: 12 周新物体偏好指数; G: 20 周新物体识别指数; H: 20 周新物体偏好指数; I: 海马 DG、CA1、CA3 区 H&E 染色结果(比例尺为 100 μm); J: 海马体定量分析。

Figure 3 The impact of exercise on cognitive behavioral tests and hippocampal morphology ($n=6-10$). A: Movement trajectory diagram in the Y-maze test; B: Novel arm exploration time at 12 weeks; C: Novel arm exploration time at 20 weeks; D: Schematic diagram of the novel object recognition test; E: Novel object recognition index at 12 weeks; F: Novel object preference index at 12 weeks; G: Novel object recognition index at 20 weeks; H: Novel object preference index at 20 weeks; I: H&E staining results in the hippocampal DG, CA1, and CA3 regions (scale bar=100 μm); J: Quantitative analysis of the hippocampus.

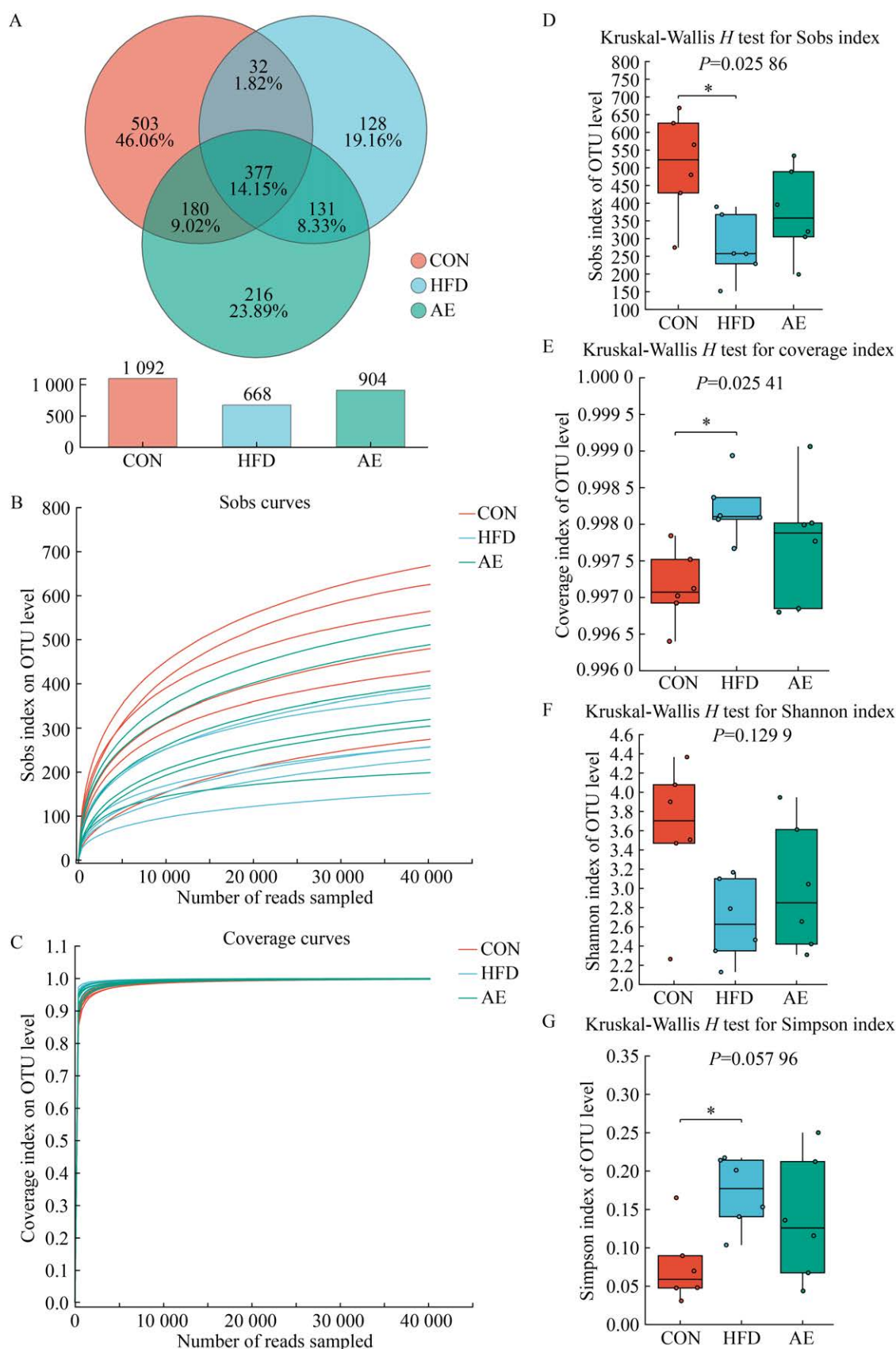
织 H&E 染色结果(图 3I)显示:CON 组海马及皮质区脑细胞结构正常,细胞核清晰、胞质丰富,间质无水肿,海马锥体细胞排列紧密;HFD 组海马及皮质区细胞缺失严重且排列松散;AE 组皮质及海马神经元密度显著增加,细胞形态及排列显著改善。定量分析结果表明,相较于 CON 组,HFD 组海马 DG 区、CA1 区及 CA3 区细胞数量显著减少;而 AE 组 DG 区、CA1 区及 CA3 区细胞数量较 HFD 组显著增加(图 3J)。

2.4 运动对肠道菌群多样性及组成的影响

如图 4A 所示,Venn 图显示 3 组共有 377 个 OTU。基于 OTU 分析物种观测指数(Sobs) (图 4B) 及覆盖度指数(coverage) (图 4C)发现,随着物种数量增加,两指数的稀释曲线趋势均逐渐趋于平缓,表明样本群落的丰富度、多样性良好,可充分反映肠道微生物信息。 α 多样性指数 Sobs 指数($P=0.025$)和 coverage 指数($P=0.025$)在 3 组间具有统计学差异(图 4D、4E),但 Shannon 指数和 Simpson 指数在 3 组间则无显著差异($P>0.05$) (图 4F、4G),相较于 CON 组,HFD 组 Sobs 指数显著降低,coverage 指数和 Simpson 指数显著升高($P<0.05$)。PCoA 结果显示,CON 组与 HFD/AE 组在 OTU 显著分离,其中第 1 主成分(PC1)解释了 29.75%的方差变异,第 2 主成分(PC2)解释了额外的 18.50% (图 4H);在属水平也显著分离,其中第 1 主成分(PC1)解释了 31.09%的方差变异,第 2 主成分(PC2)解释了额外的 25.93% (图 4I),但 HFD 组与 AE 组菌群组

成相似;门水平 3 组菌群组成均无显著差异(图 4J),进一步 NMDS 分析结果与其一致(图 4K)。

在不同组小鼠的肠道微生物群组成分析中,门水平上,厚壁菌门(*Firmicutes*)、脱硫杆菌门(*Desulfobacterota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)等为优势菌门(图 5A)。相较于 CON 组,HFD 组 *Firmicutes* 丰度显著增加,*Bacteroidota* 丰度降低,导致 *Firmicutes/Bacteroidota* 比值极显著升高($P<0.01$);相较于 HFD 组,AE 组 *Firmicutes/Bacteroidota* 比值显著降低($P<0.01$) (图 5B)。在属水平上,乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、杜博斯氏菌属(*Dubosiella*)、粪小杆菌属(*Faecalibaculum*)等在 3 个组别中为优势菌属(图 5C)。通过进化树分支图展示 3 组菌群在门至属水平的系统发育分布差异(图 5D),并基于线性判别分析(LDA 评分 >3)筛选差异菌群(图 5E)。CON 组中富集了 *norank_f_Muribaculaceae* 和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*);HFD 组中富集了 *Faecalibaculum*;AE 组中富集了 *norank_f_Desulfovibrionaceae*。进一步采用 Wilcoxon 秩和检验分析 HFD 组与 CON 组(图 5F)、HFD 组与 AE 组(图 5G)属水平差异。结果发现大肠杆菌志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)为回调菌群,其相对丰度在 HFD 组显著升高($P=0.0124$),而在 AE 组中显著降低($P=0.0181$) (图 5H)。相关性分析发现 *Escherichia-Shigella* 相对丰度与血清 LPS、肠道 LPS、IL-1 β 和 TLR4 呈显著正相关,与 SYN1 呈显著负相关(图 5I)。



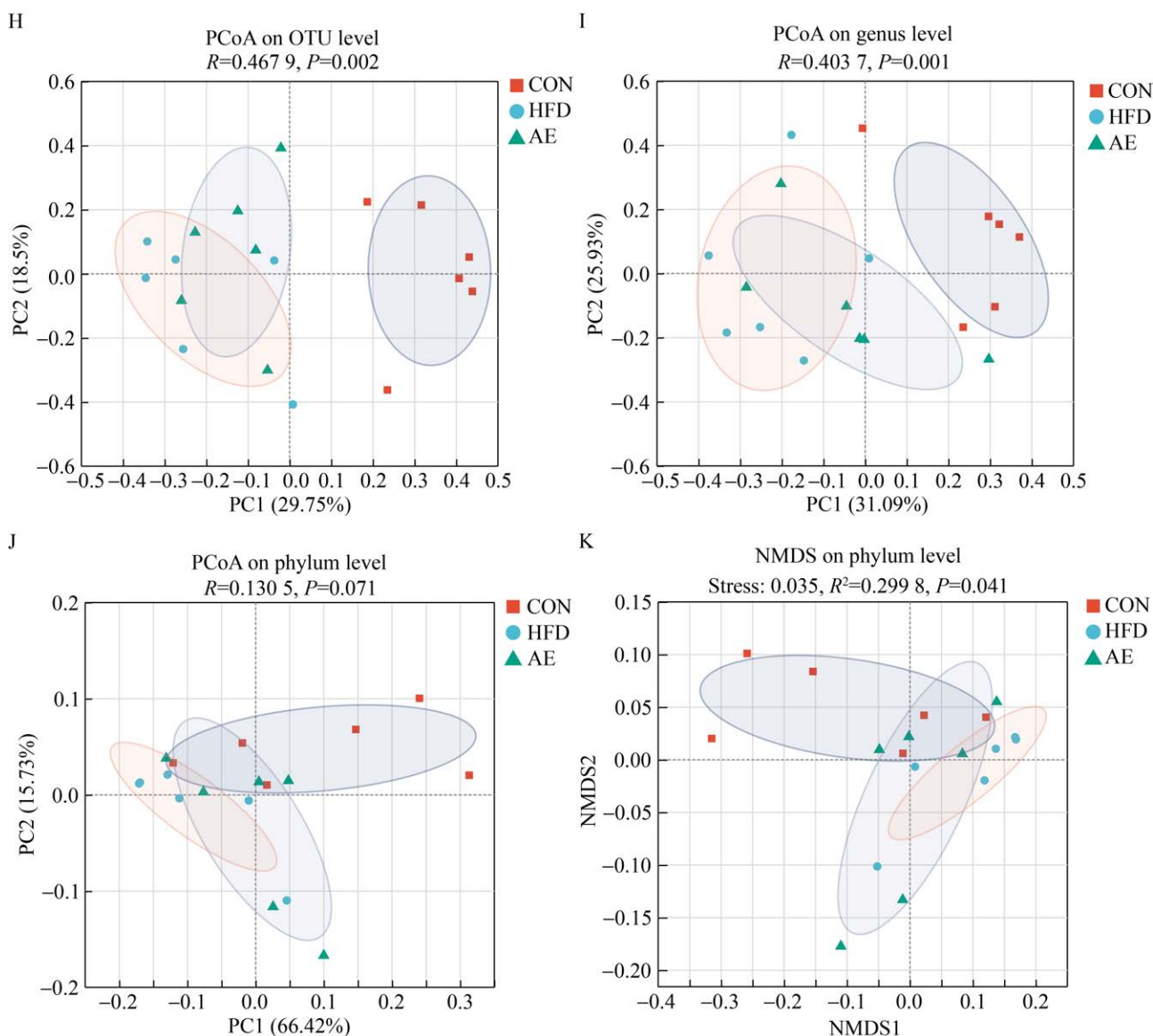
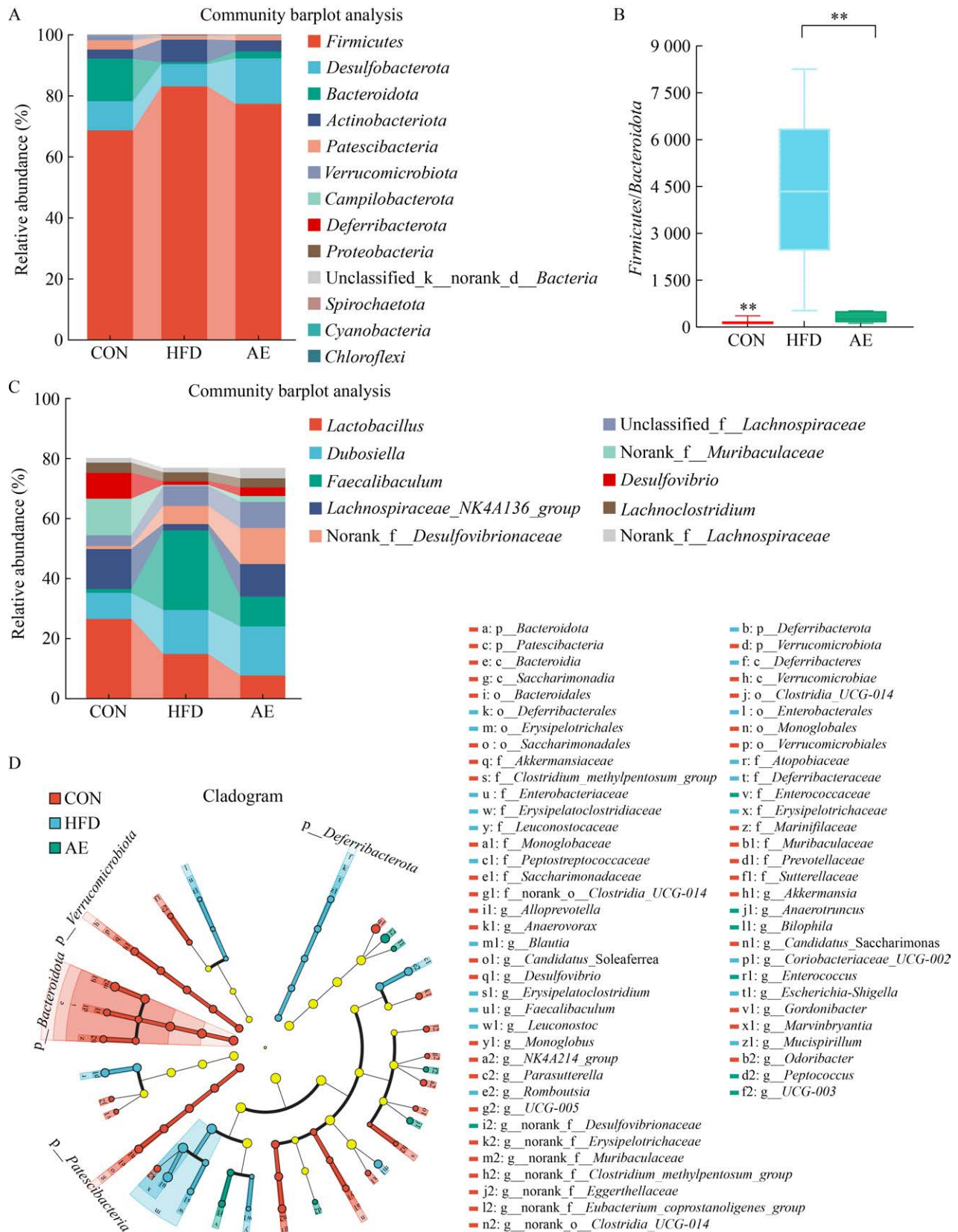
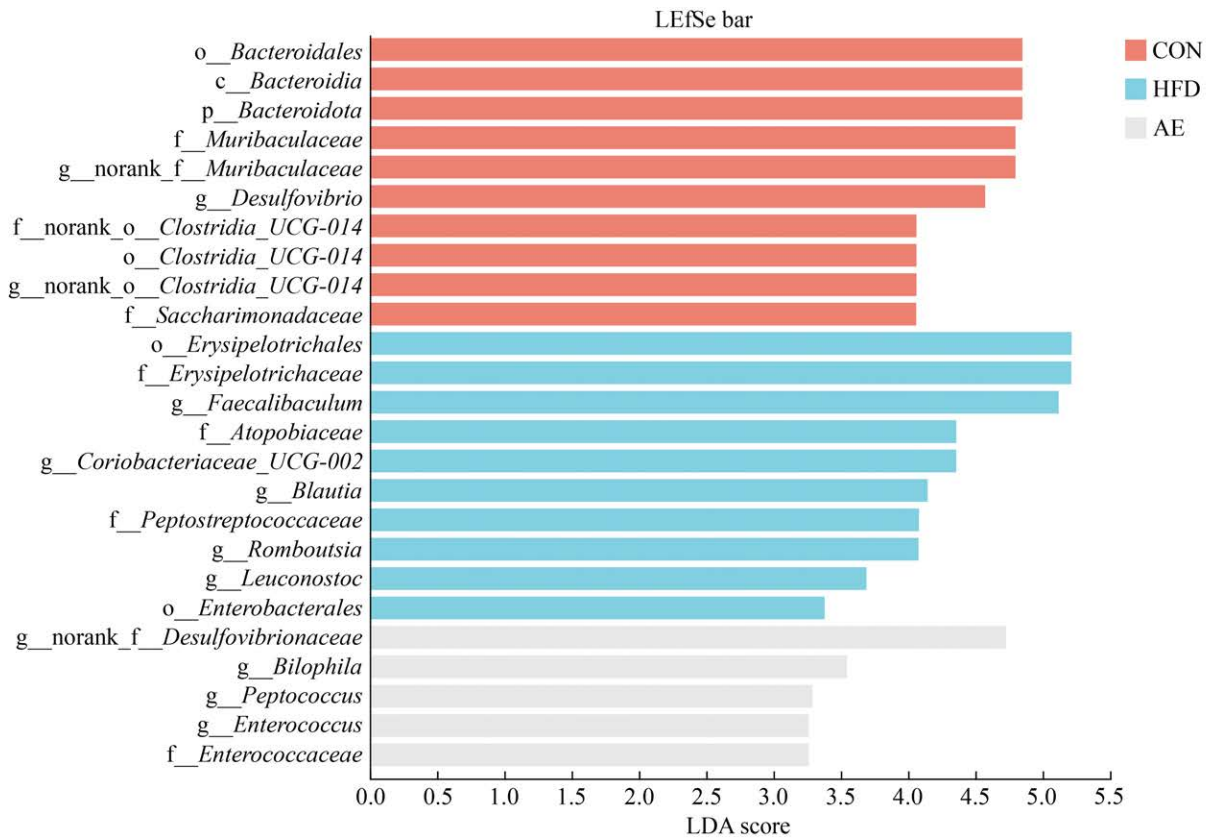


图4 运动对肠道菌群多样性和组成的影响($n=6$) A: 肠道菌群 OTU 的 Venn 图; B: 肠道菌群多样性指数 Sobs 图; C: 肠道菌群 coverage 稀释度曲线图; D: 肠道菌群 OTU 水平 Sobs 图; E: 肠道菌群 OTU 水平 coverage 图; F: 肠道菌群 OTU 水平 Shannon 图; G: 肠道菌群 OTU 水平 Simpson 图; H: 肠道菌群 OTU 水平 PCoA 图; I: 肠道菌群属水平 PCoA 图; J: 肠道菌门水平 PCoA 图; K: 肠道菌群门水平 NMDS 图。

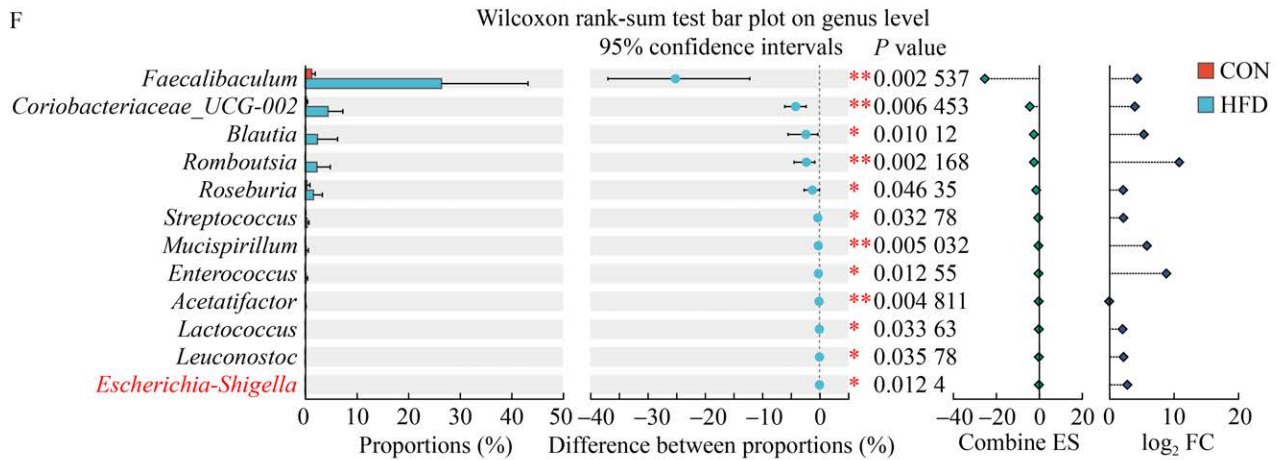
Figure 4 Impact of exercise on the diversity and structure of gut microbiota ($n=6$). A: Venn diagram of gut microbiota OTU; B: Sobs index plot of gut microbiota diversity; C: Coverage rarefaction curve of gut microbiota; D: Sobs index plot of gut microbiota at the OTU level; E: Coverage plot of gut microbiota at the OTU level; F: Shannon index plot of gut microbiota at the OTU level; G: Simpson index plot of gut microbiota at the OTU level; H: PCoA plot of gut microbiota at the OTU level; I: PCoA plot of gut microbiota at the genus level; J: PCoA plot of gut microbiota at the phylum level; K: NMDS plot of gut microbiota at the phylum level. *: Significant differences between HFD and CON (*: $P<0.05$, **: $P<0.01$).



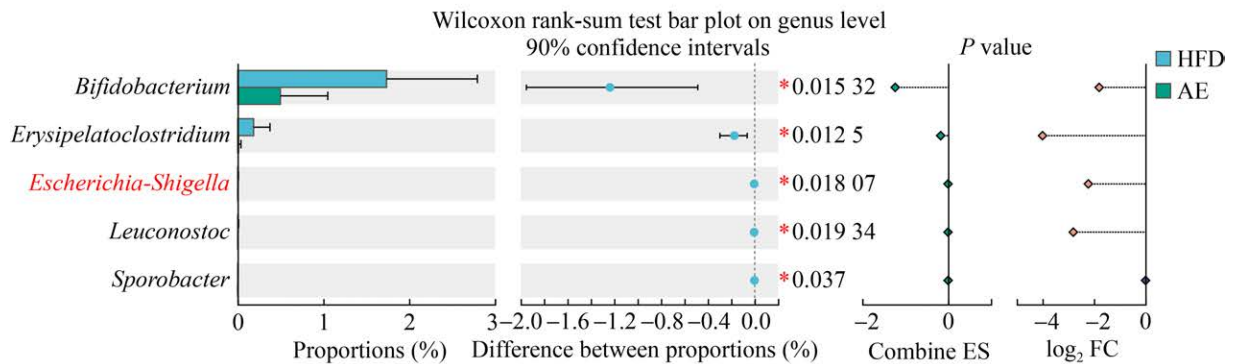
E



F



G



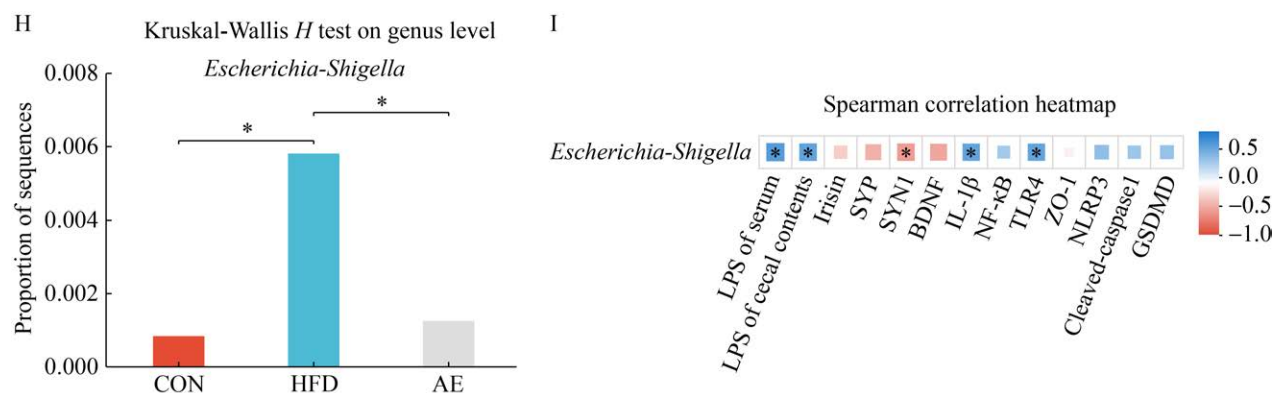


图5 运动对小鼠肠道菌群组成和关键菌群的影响 A: 门水平的菌群组成; B: *Firmicutes/Bacteroidota* 比值; C: 属水平菌群组成; D: LEfSe 分析进化树分支图, 显示 CON、HFD 和 AE 组从内环到外环的分类学水平依次为门、纲、目、科、属; E: LEfSe 分析结果显示具有 LDA 评分 >3 的生物标志物分类^[23]; F: HFD 组和 CON 组肠道菌群属水平的组间差异; G: HFD 组和 AE 组肠道菌群属水平的组间差异; H: 三组 *Escherichia-Shigella* 组间比较; I: *Escherichia-Shigella* 与炎症、细胞焦亡指标相关性分析。

Figure 5 Effects of exercise on gut microbiota composition and key microbiota in mice. A: Microbial composition at the phylum level; B: *Firmicutes/Bacteroidota* ratio; C: Microbial composition at the genus level; D: LEfSe analysis cladogram showing the taxonomic levels of CON, HFD, and AE groups from the inner to outer rings as phylum, class, order, family, and genus; E: LEfSe analysis results showing biomarkers with LDA scores >3 ^[23]; F: Differences in gut microbiota genus levels between HFD group and CON group; G: Differences in gut microbiota genus levels between HFD group and AE group; H: Comparison of *Escherichia-Shigella* among the three groups; I: Correlation analysis of *Escherichia-Shigella* with inflammatory and pyroptosis indicators. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

2.5 运动对结肠组织形态、通透性及 LPS 的影响

如图 6A 所示, H&E 染色结果显示 CON 组小鼠的结肠结构完整, 无炎症细胞浸润, 肠道黏膜上皮屏障完整; HFD 组小鼠的结肠上皮细胞排列疏松, 肠道黏膜上皮屏障缺失, 并伴随炎症细胞浸润, 病理分级为 2.83; 经过有氧运动干预后, AE 组小鼠的结肠形态显著改善, 其结肠上皮细胞排列有序, 炎症细胞浸润降低, 组织病理分级显著降低至 1.50 ($P=0.029$) (图 6B)。相较于 CON 组, HFD 组结肠组织 ZO-1 显著下调($P<0.01$); 相较于 HFD 组, AE 组结肠组织 ZO-1 蛋白相对表达量显著上调($P<0.01$) (图 6C、6D)。相较于 CON 组, HFD 组盲肠内容物和血清中 LPS 显著增加, 运动则显著降低其指标值($P<0.05$) (图 6E)。

2.6 运动对海马炎症反应、细胞焦亡和突触可塑性相关蛋白的影响

Western blotting 实验结果表明: 相较于 CON 组, HFD 组海马组织炎症反应相关蛋白 TLR4、NF-κB 相对表达量显著升高($P<0.01$) (图 7A、7B); 细胞焦亡标志蛋白 GSDMD、IL-1β、NLRP3、cleaved-caspase1 蛋白相对表达量显著升高($P<0.01$) (图 7C、7D); 突触可塑性相关蛋白 irisin、BDNF、SYP 和 SYN1 相对表达量显著下调($P<0.01$) (图 7E、7F)。运动干预后, 上述 HFD 组异常蛋白表达部分被逆转: 相较于 HFD 组, AE 组 GSDMD、IL-1β、TLR4 蛋白相对表达量显著降低 ($P<0.05$); NLRP3、cleaved-caspase1、NF-κB 相对表达量极显著降低($P<0.01$); irisin、BDNF、SYP、SYN1 蛋白水平相对显著上调。

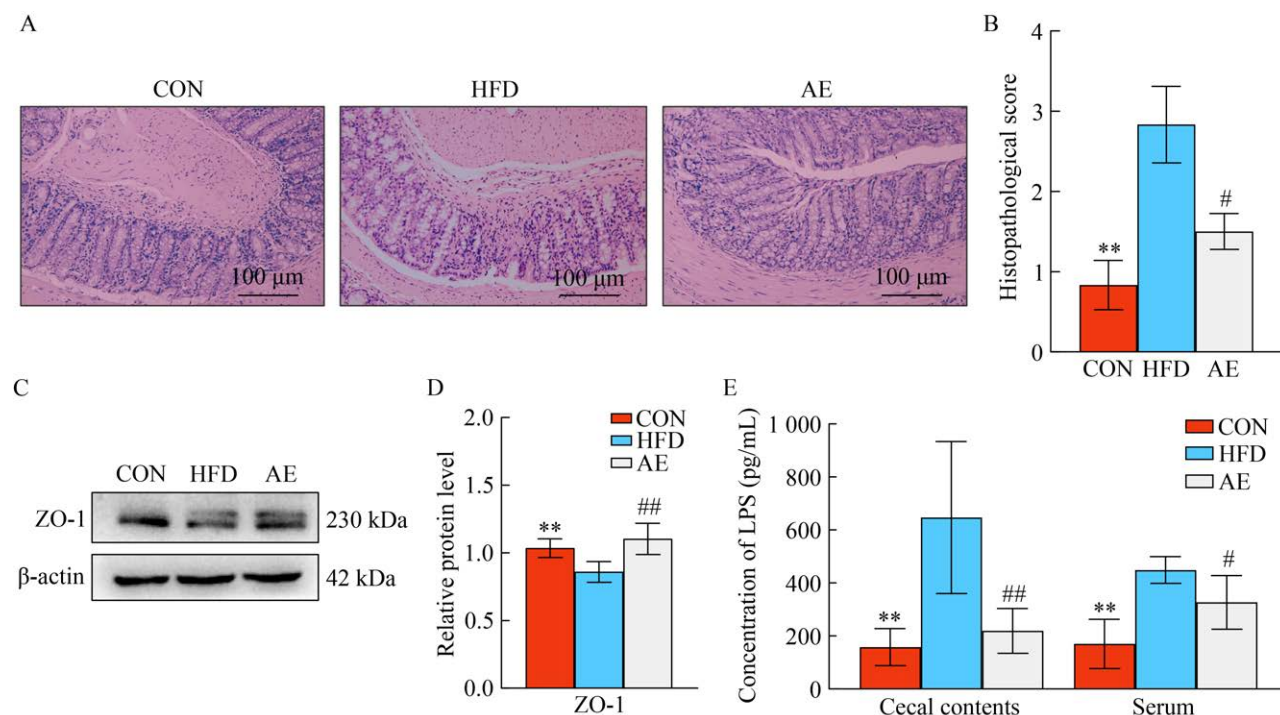


图6 运动对结肠组织形态、通透性及LPS影响 A: 结肠组织H&E染色; B: 组织病理评分; C: ZO-1蛋白原始条带($n=6$); D: ZO-1蛋白相对表达量; E: 盲肠内容物和血清LPS含量。

Figure 6 Effect of exercise on colon tissue morphology, permeability, and LPS. A: H&E staining of colonic tissue; B: Histopathological scoring; C: Original bands of ZO-1 protein ($n=6$); D: Relative expression of ZO-1 protein; E: LPS content in cecal contents and serum.

3 讨论

长期高脂饮食导致能量代谢失衡,造成血脂升高和异位脂质沉积,进而诱发外周代谢紊乱^[24]。本研究结果显示,12周高脂饮食喂养后HFD组体重显著高于CON组,并出现血脂异常(LDL-C、TC、TG显著增加)和脂肪性肝功能损伤(ALT、AST显著增加),同时伴随学习和记忆能力显著下降,并且随着高脂饮食的持续喂养,至20周时肥胖小鼠认知功能障碍进一步加重。前人研究发现仅3d高脂饮食便会诱导小鼠记忆功能受损,而在5d后发展出抑郁样行为^[25],而长期高脂饮食会通过激活海马小胶质细胞引发剧烈神经炎症反应并造成更为严重的记忆障碍^[26]。运动干预后发现,运动显著改善了肥胖相关血脂和肝功能生化指标,相较于HFD组,AE组小鼠在认知行为和海马细胞形

态方面均展现出显著改善效果。BDNF信号通路与轴突生长和成熟过程有关,该通路受损参与认知功能障碍发病进程,前人研究发现肥胖小鼠海马中BDNF水平降低,神经元树突棘密度显著减少^[27]。在本研究中同样观察到HFD组小鼠BDNF、SYN和SYN1表达水平显著降低,而运动则逆转上述变化,研究结果支持前人研究成果^[13,28-32]。Irisin作为高度响应运动刺激的肌因子,可通过上调BDNF信号通路表达调控突触可塑性。在阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)小鼠模型中,运动或外源性irisin补充均可显著上调海马中irisin/BDNF信号通路表达,并增强AD小鼠的认知功能、模式分离能力和恐惧条件反射表现,然而上述现象在全身irisin敲除的AD小鼠中无法复现^[33]。在肥胖小鼠模型中同样观察到,持续低强度和间歇性高强度有氧运

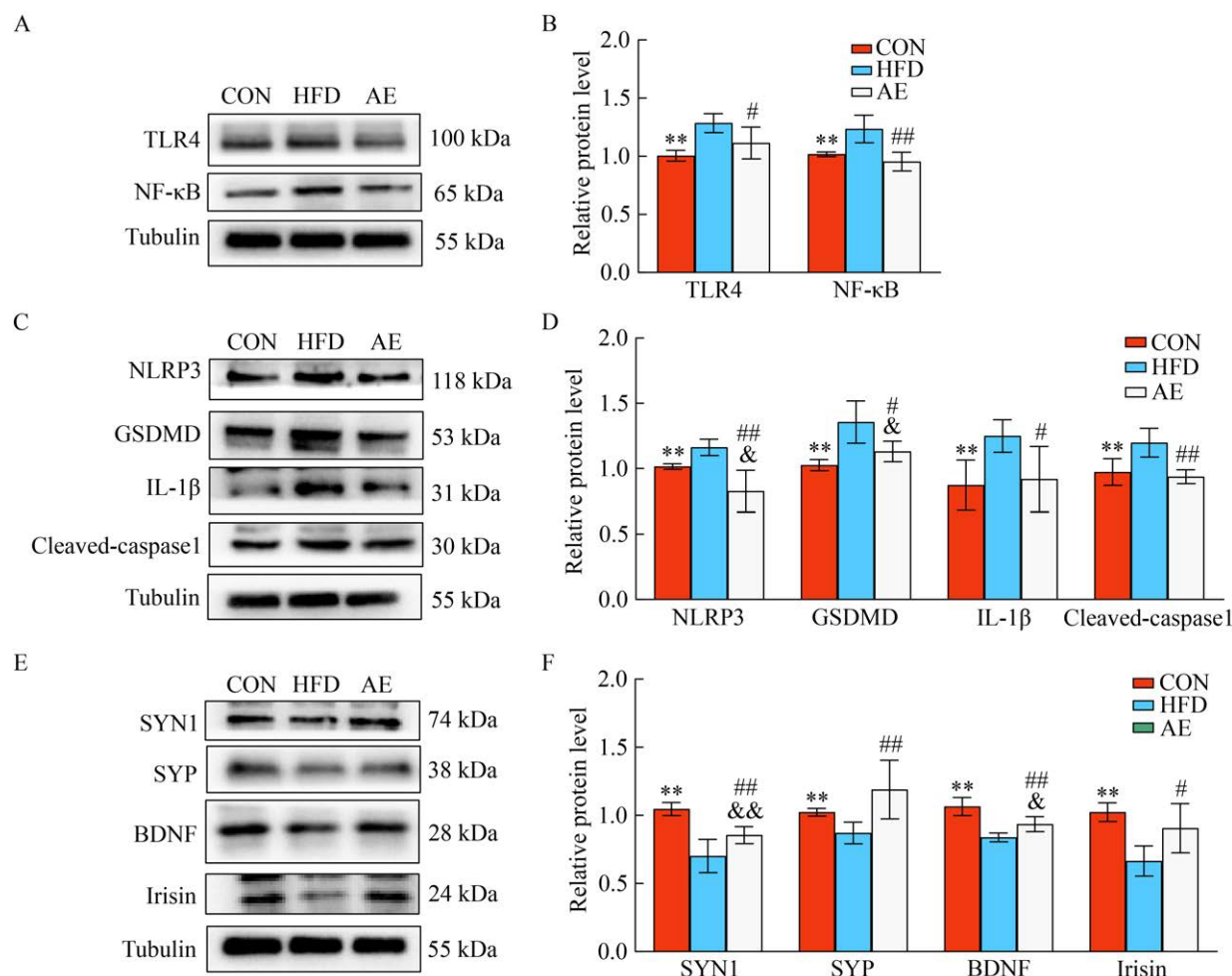


图 7 运动海马炎症反应、细胞焦亡和突触可塑性相关蛋白的影响 A: TLR4、NF- κ B 蛋白原始条带 ($n=6$); B: TLR4、NF- κ B 蛋白相对表达量; C: NLRP3、GSDMD、IL-1 β 、cleaved-caspase1 蛋白原始条带 ($n=6$); D: NLRP3、GSDMD、IL-1 β 、cleaved-caspase1 蛋白相对表达量; E: SYN1、SYP、BDNF、irisin 蛋白原始条带 ($n=6$); F: SYN1、SYP、BDNF、irisin 蛋白相对表达量。

Figure 7 Effects of proteins involved in inflammatory response, pyroptosis, and synaptic plasticity in the motor hippocampus. A: Original bands of TLR4 and NF- κ B proteins ($n=6$); B: Relative expression of TLR4 and NF- κ B proteins; C: Original bands of NLRP3, GSDMD, IL-1 β , and cleaved-caspase1 proteins ($n=6$); D: Relative expression of NLRP3, GSDMD, IL-1 β , and cleaved-caspase1 proteins; E: Original bands of SYN1, SYP, BDNF, and irisin proteins ($n=6$); F: Relative expression of SYN1, SYP, BDNF, and irisin proteins.

动均会通过激活海马中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PGC-1 α)/irisin 信号通路显著上调 BDNF 表达, 并通过改善肥胖小鼠 CNS 损伤来预防或治疗肥胖相关认知障碍^[13]。本研究也发现中等强度有氧运动逆转了高脂膳食诱导 irisin 表达下调, 支

持 irisin 是运动改善肥胖相关认知障碍中的重要调控因子。但就 irisin 增幅而言, 中等强度有氧运动不及间歇性高强度运动, 推测其背后原因可归结于高强度间歇运动可能在短时间内激活更多的肌肉纤维, 从而更有效地促进 irisin 的分泌与循环^[34]。

高脂饮食可诱导肠道微生态失调, 导致肠

道菌群组成发生显著变化,表现为条件致病菌 [*Lactobacillus*、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)]增加,而有益菌[别样棒菌属(*Allobaculum*)、梭菌属(*Clostridium*)、阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)]减少^[35],在门水平上 *Firmicutes/Bacteroidota* 比值是衡量肠道菌群稳态的重要指标之一, *Firmicutes* 能够高效分解复杂碳水化合物,增加宿主的能量获取效率从而诱导肥胖,而 *Bacteroidota* 则与免疫系统有关,高脂饮食通过诱导剧烈的炎症反应影响宿主的免疫系统和肠道屏障功能,间接抑制 *Bacteroidota* 生长^[36-37]。本研究发现 HFD 组 *Firmicutes/Bacteroidota* 比值显著增加,而 AE 组显著降低,说明运动改善了高脂饮食诱导的肠道微生态失衡。在属水平上, HFD 组显著富集 *Faecalibaculum*, 研究指出 *Faecalibaculum* 过度增殖会通过损害胆汁酸代谢激活肝脏法尼酯 X 受体/小异二聚体伴侣 (farnesoid Farnesoid X receptor/small heterodimer chaperone, FXR-SHP) 轴表达加剧胆固醇积累,造成血脂增加诱发肥胖^[38],因此 HFD 组血脂代谢异常可能与该菌群相对丰度异常增加有关。

另外,本研究发现条件致病菌 *Escherichia-Shigella* 相对丰度在 HFD 组中显著增加,这与前人研究结果^[39]一致,这种增加可归结于肥胖状态下宿主肠道微环境的低度炎症为其提供了有利的生长条件。*Escherichia-Shigella* 作为一种细胞壁含有丰富 LPS 的革兰氏阴性促炎菌,其自身产生的志贺毒素和肠毒素会直接损伤肠上皮细胞,并通过黏附和侵入机制破坏肠道黏膜屏障^[40];而过度增殖导致的大量 LPS 能够通过降低 ZO-1 表达进一步破坏肠道黏膜屏障完整性,减少黏液分泌加剧肠道损伤,又能够透过受损的肠道屏障进入体循环,并通过激活 TLR4/NF- κ B 信号通路引发全身性炎症反应^[41]。LPS 与 TLR4 结合激活中枢神经炎症反应在肥胖小鼠模型中得到因果关系证实,TLR4 特异性缺失显著减轻

LPS 诱导的神经炎症和奖赏神经回路失调^[42]。本研究发现, HFD 组中盲肠内容物和血清中的 LPS 显著增加,同时 ZO-1 表达显著降低, LPS 通过激活 TLR4/NF- κ B 信号通路诱发剧烈神经炎症反应,继而降低突触可塑性,最终导致肥胖相关认知障碍发生。而在运动干预后 *Escherichia-Shigella* 相对丰度、盲肠内容物及血清 LPS, 以及 TLR4/NF- κ B 信号通路的活化程度均显著降低,结肠组织 ZO-1 表达水平显著增加,相关性分析发现 *Escherichia-Shigella* 相对丰度与血清和粪便中的 LPS、IL-1 β 、TLR4 呈显著正相关,与 SYN1 呈显著负相关,说明运动能够通过抑制高脂饮食导致的 *Escherichia-Shigella* 的过度生长,减少 LPS 的产生和释放并增强肠道屏障功能,并通过降低神经炎症改善突触可塑性,有效减轻肥胖相关认知障碍 NF- κ B 信号通路激活除了介导炎症反应外,还能够促进 NLRP3 炎症小体的组装和激活,并通过活化 caspase-1 裂解 GSDMD 生成 GSDMD-N 片段,使其在细胞膜上形成孔隙,导致细胞肿胀破裂,并释放 IL-1 β 等炎症因子,引发细胞焦亡^[43]。体外细胞研究^[44]证实,棕榈酸处理 BV2 小胶质细胞模拟高脂环境下的变化后发现, TLR4/NF- κ B 信号通路表达显著上调,继而促进 NLRP3 炎症小体活化,流式细胞术检测 caspase-1 表达发现细胞焦亡率显著增加,提示 NF- κ B/NLRP3 信号通路诱导的细胞焦亡在肥胖相关认知障碍中发挥重要作用。本研究结果发现,高脂饮食显著上调 NLRP3、cleaved-caspase1、GSDMD 以及 IL-1 β 的表达水平,而在 AE 组中上述蛋白的表达均显著降低,说明运动能够通过抑制 NF- κ B/NLRP3 信号通路减少神经元细胞焦亡,抑制炎症因子 IL-1 β 表达,减轻炎症反应改善肥胖相关认知障碍。既往研究表明,运动可通过多种机制缓解肥胖相关认知障碍,包括改善前额叶皮质损伤^[13]、促进海马神经元的轴突生长、增加树突棘数量性^[14]、促进多巴胺、5-羟色

胺等神经递质释放^[45]、降低海马胰岛素抵抗以及抗炎效应^[15]，本研究结果进一步揭示，运动抵抗认知障碍的益处还与“微生物-肠-脑”轴的积极调节，以及对 NF- κ B/NLRP3 细胞焦亡通路的抑制作用有关。

然而，本研究仍存在一定的局限，如缺乏运动调控 NF- κ B/NLRP3 信号通路的回复实验、运动对 *Escherichia-Shigella* 的直接调节作用，以及其自身的促炎属性，下一步的研究需进一步开展体外细胞实验，通过敲除或过表达关键因子(ZO-1、NF- κ B、NLRP3、TLR4 等)；或进

行菌群移植实验，观察移植肥胖小鼠肠道菌群的无菌鼠是否会出现肥胖相关认知障碍的表型，以此验证其背后的直接因果关联。

4 结论

运动通过调节肠道微环境，抑制高脂饮食诱导的 *Escherichia-Shigella* 过度生长，减少 LPS 的产生和释放并增强肠道屏障功能，继而通过微生物-肠-脑轴抑制 NF- κ B/NLRP3 通路减轻细胞焦亡，下调炎症因子 IL-1 β 表达，防治肥胖相关认知障碍(图 8)。

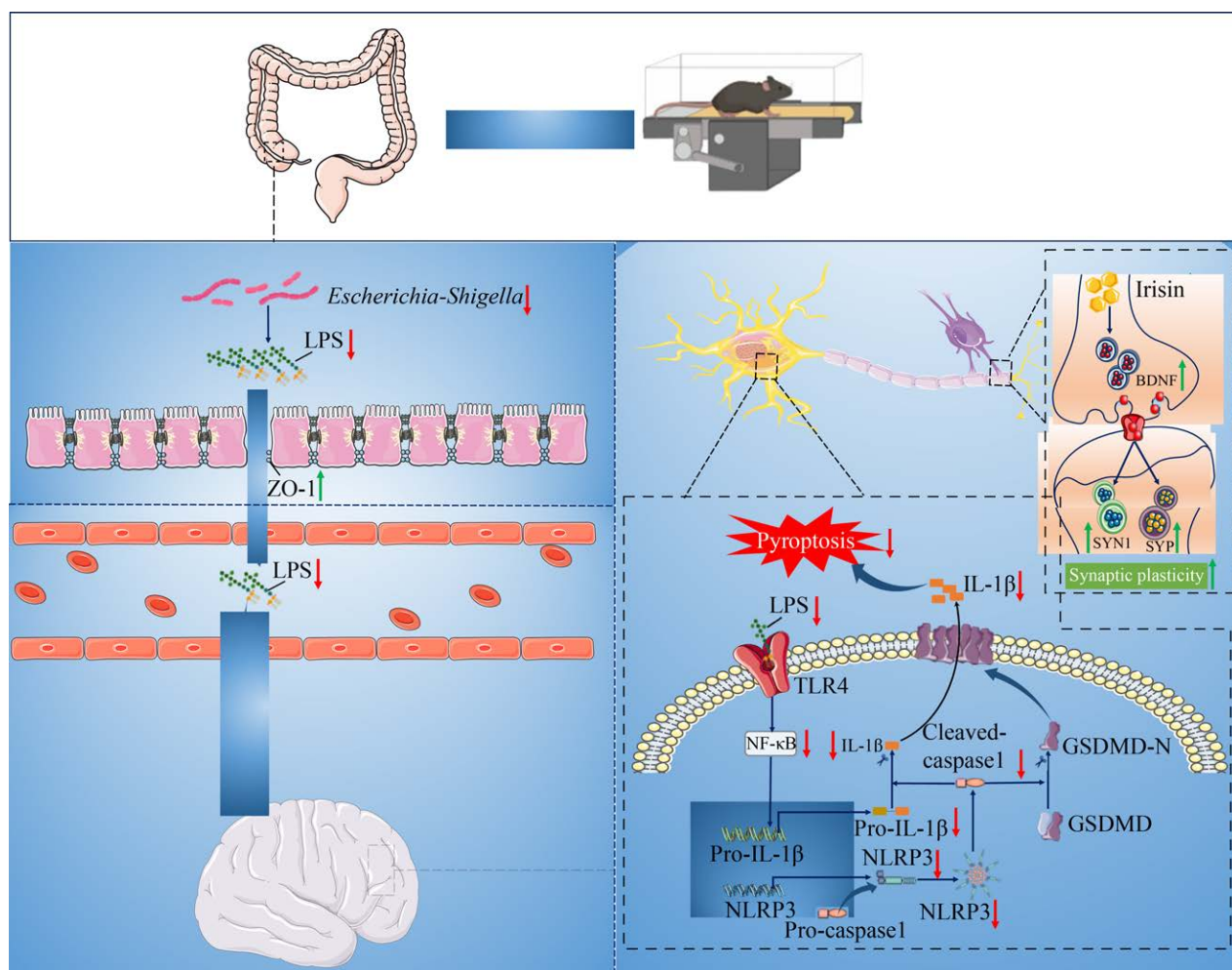


图 8 运动通过微生物-肠-脑轴改善肥胖相关认知障碍分子机制

Figure 8 Molecular mechanism of exercise in improving obesity-related cognitive impairment through microbial-gut-brain axis.

作者贡献声明

雷森林：设计实验流程，参与实验，收集与分析数据，撰写文章，制作图表；湛晓安、王兆锋：指导实验，修改论文；宋为正：参与实验，收集部分数据；李先辉：获取基金，修改论文。

作者利益冲突公开声明

文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

REFERENCES

- [1] LEI Y, LIANG X, SUN YN, YAO T, GONG HY, CHEN ZH, GAO YQ, WANG H, WANG R, HUANG YQ, YANG T, YU M, LIU LQ, YI CX, WU QF, KONG XX, XU X, LIU SP, ZHANG Z, LIU TM. Region-specific transcriptomic responses to obesity and diabetes in macaque hypothalamus[J]. *Cell Metabolism*, 2024, 36(2): 438-453.e6.
- [2] GHOSH P, FONTANELLA RA, SCISCIOLA L, TAKTAZ F, PESAPANE A, BASILICATA MG, TORTORELLA G, MATAACCHIONE G, CAPUANO A, VIETRI MT, SELVAGGI F, PAOLISSO G, BARBIERI M. Obesity-induced neuronal senescence: Unraveling the pathophysiological links[J]. *Ageing Research Reviews*, 2024, 101: 102533.
- [3] MINA T, YEW YW, NG HK, SADHU N, WANSACHONG G, DALAN R, Dorraian Yan Wen Low, LAM BCC, RIBOLI E, LEE ES, NGEOW J, ELLIOTT P, GRIVA K, LOH M, LEE J, CHAMBERS J. Adiposity impacts cognitive function in Asian populations: an epidemiological and Mendelian Randomization study[J]. *The Lancet Regional Health Western Pacific*, 2023, 33: 100710.
- [4] BOWMAN K, THAMBISETTY M, KUCHEL GA, FERRUCCI L, MELZER D. Obesity and longer term risks of dementia in 65–74 year olds[J]. *Age and Ageing*, 2019, 48(3): 367-373.
- [5] KULLMANN S, HENI M, HALLSCHMID M, FRITSCH A, PREISSEL H, HÄRING HU. Brain insulin resistance at the crossroads of metabolic and cognitive disorders in humans[J]. *Physiological Reviews*, 2016, 96(4): 1169-1209.
- [6] LIVINGSTON G, HUNTLEY J, LIU KY, COSTAFREDA SG, SELBÆK G, ALLADI S, AMES D, BANERJEE S, BURNS A, BRAYNE C, FOX NC, FERRI CP, GITLIN LN, HOWARD R, KALES HC, KIVIMÄKI M, LARSON EB, NAKASUJJA N, ROCKWOOD K, SAMUS Q, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2024 report of the Lancet standing Commission[J]. *The Lancet*, 2024, 404(10452): 572-628.
- [7] 田春平, 王青燕, 高慧, 马佳蕊, 吴佳俊, 杜嘉妮, 胡倩倩, 杨彦玲. 肠道菌群在脊髓损伤后认知功能障碍中的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(11): 4383-4393.
- [8] TIAN CP, WANG QY, GAO H, MA JR, WU JJ, DU JN, HU QQ, YANG YL. Gut microbiota in cognitive dysfunction after spinal cord injury: a review[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(11): 4383-4393 (in Chinese).
- [9] ZHENG MX, YE HY, YANG XY, SHEN LJ, DANG XM, LIU XL, GONG YY, WU QY, WANG L, GE X, FANG XL, HOU BC, ZHANG P, TANG RX, ZHENG KY, HUANG XF, YU YH. Probiotic *Clostridium butyricum* ameliorates cognitive impairment in obesity via the microbiota-gut-brain axis[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2024, 115: 565-587.
- [10] SCHROEDER BO, BIRCHENOUGH GMH, STÄHLMAN M, ARIKE L, JOHANSSON MEV, HANSSON GC, BÄCKHED F. Bifidobacteria or fiber protects against diet-induced microbiota-mediated colonic mucus deterioration[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 23(1): 27-40.e7.
- [11] CHEN JL, XIAO YH, LI DM, ZHANG SQ, WU YZ, ZHANG Q, BAI WB. New insights into the mechanisms of high-fat diet mediated gut microbiota in chronic diseases[J]. *iMeta*, 2023, 2(1): e69.
- [12] HUANG PT, ZHANG ZY, ZHANG P, FENG JZ, XIE JW, ZHENG YJ, LIANG XM, ZHU BY, CHEN ZZ, FENG SJ, WANG LJ, LU JH, LIU YW, ZHANG YH. TREM2 deficiency aggravates NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis in MPTP-induced Parkinson's disease mice and LPS-induced BV2 cells[J]. *Molecular Neurobiology*, 2024, 61(5): 2590-2605.
- [13] XU X, XU Y, SHI RL. Association between obesity, physical activity, and cognitive decline in Chinese middle and old-aged adults: a mediation analysis[J]. *BMC Geriatrics*, 2024, 24(1): 54.
- [14] 张鹏鹏. 持续和间歇运动上调 PGC-1 α /irisin/BDNF 表达改善肥胖小鼠认知功能障碍[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2023, 39(9): 1346-1355.
- [15] ZHANG PP. Continuous and intermittent exercise upregulates PGC-1 α /irisin/BDNF expression to improve obesity-induced cognitive impairment in mice[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2023, 39(9): 1346-1355 (in Chinese).
- [16] 严梦思, 舒麟捷, 王朝格, 程冉, 牟连伟, 廖静雯. 运动调控海马神经元结构可塑性和神经发生改善高脂饮食诱导的肥胖小鼠记忆损害[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2025, 52(4): 995-1007.
- [17] YAN MS, SHU LJ, WANG CG, CHENG R, MU LW, LIAO JW. Exercise regulates structural plasticity and neurogenesis of hippocampal neurons and improves memory impairment in high-fat diet-induced obese mice[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2025, 52(4): 995-1007 (in Chinese).
- [18] de MIGUEL Z, KHOURY N, BETLEY MJ, LEHALLIER B, WILLOUGHBY D, OLSSON N, YANG AC, HAHN O, LU NN, VEST RT, BONANNO LN, YERRA L, ZHANG LC, SAW NL, FAIRCHILD JK, LEE D, ZHANG H, McALPINE PL, CONTREPOIS K, SHAMLOO M, ELIAS JE, RANDO TA, WYSS-CORAY T. Exercise plasma boosts memory and dampens brain inflammation via clusterin[J]. *Nature*, 2021, 600(7889): 494-499.
- [19] ZHANG L, ZOU WY, HU YY, WU HH, GAO Y,

- ZHANG JQ, ZHENG J. Voluntary wheel running ameliorated the deleterious effects of high-fat diet on glucose metabolism, gut microbiota and microbial-associated metabolites[J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(3): 1672-1684.
- [17] HAO S, DEY A, YU XL, STRANAHAN AM. Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity[J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2016, 51: 230-239.
- [18] SHERAFATI-MOGHADAM M, PAHLAVANI HA, DARYANOOSH F, SALESI M. The effect of high-intensity interval training (HIIT) on protein expression in Flexor Hallucis Longus (FHL) and soleus (SOL) in rats with type 2 diabetes[J]. Journal of Diabetes and Metabolic Disorders, 2022, 21(2): 1499-1508.
- [19] ZHENG Y, QIN ZS, TSOI B, SHEN JG, ZHANG ZJ. Electroacupuncture on trigeminal nerve-innervated acupoints ameliorates poststroke cognitive impairment in rats with middle cerebral artery occlusion: involvement of neuroprotection and synaptic plasticity[J]. Neural Plasticity, 2020, 2020: 8818328.
- [20] YOSHIZAKI K, ASAI M, HARA T. High-fat diet enhances working memory in the Y-maze test in male C57BL/6J mice with less anxiety in the elevated plus maze test[J]. Nutrients, 2020, 12(7): 2036.
- [21] 刘芸芸, 张冬娜, 李善智, 朱羿龙, 方瑞康, 朱光泽, 李一权, 宗宇平, 韩继成. 4'-羟基查尔酮通过调节 Th17/Treg 平衡治疗溃疡性结肠炎[J]. 中国病理生理杂志, 2025, 41(1): 81-89.
- LIU YY, ZHANG DN, LI SZ, ZHU YL, FANG RK, ZHU GZ, LI YQ, ZONG YP, HAN JC. 4'-hydroxychalcone attenuates ulcerative colitis by regulating Th17/Treg homeostasis[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2025, 41(1): 81-89 (in Chinese).
- [22] LIU CS, ZHAO DF, MA WJ, GUO YD, WANG AJ, WANG QL, LEE DJ. Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters in the presence of *Halomonas* sp.[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(3): 1421-1426.
- [23] 高禹涵, 陈海娟, 马永贵, 尚军, 张国燕, 张文剑. 基于肠道菌群及代谢组学探讨藏药十味乳香胶囊对类风湿性关节炎大鼠的治疗及其作用机制[J]. 药学报, 2024, 59(12): 3304-3314.
- GAO YH, CHEN HJ, MA YG, SHANG J, ZHANG GY, ZHANG WJ. Therapeutic effect and mechanism of Shiwei-Ruxiang-capsule on rheumatoid arthritis based on intestinal flora and metabolomics[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2024, 59(12): 3304-3314 (in Chinese).
- [24] QI Y, WANG XF. The role of gut microbiota in high-fat-diet-induced diabetes: lessons from animal models and humans[J]. Nutrients, 2023, 15(4): 922.
- [25] de PAULA GC, BRUNETTA HS, ENGEL DF, GASPAS JM, VELLOSO LA, ENGBLOM D, de OLIVEIRA J, de BEM AF. Hippocampal function is impaired by a short-term high-fat diet in mice: increased blood-brain barrier permeability and neuroinflammation as triggering events[J]. Frontiers in Neuroscience, 2021, 15: 734158.
- [26] ZHUANG H, YAO XT, LI H, LI Q, YANG CX, WANG CH, XU D, XIAO Y, GAO Y, GAO JY, BI MZ, LIU R, TENG GJ, LIU LJ. Long-term high-fat diet consumption by mice throughout adulthood induces neurobehavioral alterations and hippocampal neuronal remodeling accompanied by augmented microglial lipid accumulation[J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2022, 100: 155-171.
- [27] 胡佳, 许傲雪, 胡锐, 薛琦, 黄春霞, 张野. CXCL7/CXCR2 轴调控突触可塑性在肥胖相关认知功能障碍中的作用[J]. 中国药理学通报, 2024, 40(5): 881-886.
- HU J, XU AX, HU R, XUE Q, HUANG CX, ZHANG Y. Effect of CXCL7/CXCR2 axis on synaptic plasticity in obesity-related cognitive dysfunction[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2024, 40(5): 881-886 (in Chinese).
- [28] PARK HS, PARK SS, KIM CJ, SHIN MS, KIM TW. Exercise alleviates cognitive functions by enhancing hippocampal insulin signaling and neuroplasticity in high-fat diet-induced obesity[J]. Nutrients, 2019, 11(7): 1603.
- [29] LIM G, LEE H, LIM Y. Potential effects of resistant exercise on cognitive and muscle functions mediated by myokines in sarcopenic obese mice[J]. Biomedicines, 2022, 10(10): 2529.
- [30] ZHANG H, LIANG JL, WU QY, LI JX, LIU Y, WU LW, HUANG JL, WU XW, WANG MH, CHEN N. Swimming suppresses cognitive decline of HFD-induced obese mice through reversing hippocampal inflammation, insulin resistance, and BDNF level[J]. Nutrients, 2022, 14(12): 2432.
- [31] MARYAM K, ALI H. Aerobic and resistance exercises affect the BDNF/TrkB signaling pathway, and hippocampal neuron density of high-fat diet-induced obese elderly rats[J]. Physiology & Behavior, 2023, 264: 114140.
- [32] PANTIYA P, THONUSIN C, CHUNCHAI T, ONGNOK B, NAWARA W, ARUNSAK B, CHATTIPAKORN N, CHATTIPAKORN SC. Higher untrained fitness exerts a neuroprotection in Independence to caloric restriction or exercise in high-fat diet-induced obesity[J]. Experimental Neurology, 2023, 365: 114416.
- [33] ISLAM MR, VALARIS S, YOUNG MF, HALEY EB, LUO RH, BOND SF, MAZUERA S, KITCHEN RR, CALDARONE BJ, BETTIO LEB, CHRISTIE BR, SCHMIDER AB, SOBERMAN RJ, BESNARD A, JEDRYCHOWSKI MP, KIM H, TU H, KIM E, CHOI SH, TANZI RE, SPIEGELMAN BM, WRANN CD. Exercise hormone irisin is a critical regulator of cognitive function[J]. Nature Metabolism, 2021, 3(8): 1058-1070.
- [34] 章森, 邹勇, 漆正堂, 刘微娜. 鸢尾素介导运动干预神经精神疾病的潜在机制[J]. 上海体育学院学报, 2023, 47(4): 39-50.
- ZHANG S, ZOU Y, QI ZT, LIU WN. Potential mechanism of irisin-mediated exercise's intervention in neuropsychiatric diseases[J]. Journal of Shanghai University of Sport, 2023, 47(4): 39-50 (in Chinese).
- [35] AL MAMUN MA, RAKIB A, MANDAL M, SINGH UP. Impact of a high-fat diet on the gut microbiome: a comprehensive study of microbial and metabolite shifts during obesity[J]. Cells, 2025, 14(6): 463.
- [36] STOJANOV S, BERLEC A, ŠTRUKELJ B. The influence of probiotics on the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in the treatment of obesity and inflammatory

- bowel disease[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1715.
- [37] LIU Y, JIN Y, LI J, ZHAO L, LI ZT, XU J, ZHAO FY, FENG J, CHEN HN, FANG CY, SHILPAKAR R, WEI YW. Small bowel transit and altered gut microbiota in patients with liver cirrhosis[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 470.
- [38] XU HT, FANG F, WU KZ, SONG JP, LI YQ, LU XY, LIU JC, ZHOU LY, YU WQ, YU F, GAO J. Gut microbiota-bile acid crosstalk regulates murine lipid metabolism *via* the intestinal FXR-FGF19 axis in diet-induced humanized dyslipidemia[J]. *Microbiome*, 2023, 11(1): 262.
- [39] AHMAD MI, IJAZ MU, HUSSAIN M, HAQ IU, ZHAO D, LI CB. High-fat proteins drive dynamic changes in gut microbiota, hepatic metabolome, and endotoxemia-TLR-4-NF κ B-mediated inflammation in mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(42): 11710-11725.
- [40] PAKBIN B, BRÜCK WM, BRÜCK TB. Molecular mechanisms of *Shigella* pathogenesis; recent advances[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3): 2448.
- [41] WANG NN, DILIXIATI Y, XIAO L, YANG H, ZHANG ZL. Different short-chain fatty acids unequally modulate intestinal homeostasis and reverse obesity-related symptoms in lead-exposed high-fat diet mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(34): 18971-18985.
- [42] HUWART SJP, FAYT C, GANGAROSSA G, LUQUET S, CANI PD, EVERARD A. TLR4-dependent neuroinflammation mediates LPS-driven food-reward alterations during high-fat exposure[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2024, 21(1): 305.
- [43] GAO J, LIU Y, LI R, LIU Y, QI Z, ZHANG Z. DCAAA mitigates neuroinflammation and microglial pyroptosis in spinal cord injury by inhibiting PI3K/AKT/NF- κ B and NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2025, 7(10): 1-17.
- [44] YANG CX, SUI GH, WANG L, CHEN Z, WANG F. miR-124 prevents the microglial proinflammatory response by inhibiting the activities of TLR4 and downstream NLRP3 in palmitic acid-treated BV2 cells[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2022, 72(3): 496-506.
- [45] ANDO S, FUJIMOTO T, SUDO M, WATANUKI S, HIRAOKA K, TAKEDA K, TAKAGI Y, KITAJIMA D, MOCHIZUKI K, MATSUURA K, KATAGIRI Y, NASIR FM, LIN YC, FUJIBAYASHI M, COSTELLO JT, McMORRIS T, ISHIKAWA Y, FUNAKI Y, FURUMOTO S, WATABE H, et al. The neuromodulatory role of dopamine in improved reaction time by acute cardiovascular exercise[J]. *Journal of Physiology*, 2024, 602(3): 461-484.