



研究报告

隔日禁食对帕金森病模型小鼠肠道屏障的保护作用及机制

张博枰 赵丽萍 石芸 洪慧 周玉 周芝兰 贾雪冰 乔晨萌 赵炜疆 崔春
申延琴*

江南大学无锡医学院神经退行性疾病与损伤研究室 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】帕金森病是一种神经退行性疾病,常伴有胃肠功能障碍等非运动症状。肠道菌群紊乱与肠上皮通透性增强是引起肠道屏障功能障碍的主要因素。饮食限制可改善肠道菌群的构成、维持肠上皮稳态。本文假设隔日禁食对帕金森病模型小鼠肠道屏障有保护作用,其机制可能与纠正肠道菌群的失调以及促进肠紧密连接蛋白的表达有关。【目的】探究隔日禁食对帕金森病模型小鼠肠道屏障的保护作用及其机制。【方法】32只C57BL/6小鼠随机分成生理盐水+自由饮食组(NS+AL组, n=8)、生理盐水+隔日禁食组(NS+ADF组, n=8)、MPTP+自由饮食组(MPTP+AL组, n=8)、MPTP+隔日禁食组(MPTP+ADF组, n=8)共4组。隔日禁食方案以48 h为一个实验周期,前24 h采取禁食,后24 h采取自由摄食,在第12–14个周期内连续5 d给予小鼠腹腔注射1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)建立帕金森病模型。在隔日禁食17个周期结束后收集小鼠粪便,通过16S rRNA基因高通量测序检测小鼠肠道菌群的变化;小鼠行为学测试后收集其空肠组织,通过HE染色观察肠道病理组织学变化,通过RT-qPCR方法检测AMPK、Occludin、ZO-1的mRNA表达水平(*Prkaa1*、*Ocln*、*Tjp1*),通过Western blotting方法检测ZO-1的蛋白表达水平。【结果】行为学测试结果显示,与NS+AL组相比, MPTP+AL组小鼠运动能力显著下降($P<0.01$),而MPTP+ADF组小鼠运动障碍有所改善($P<0.01$)。HE染色可见NS+AL组小鼠空肠绒毛结构完整、排列紧密, MPTP+AL组空肠绒毛破碎甚至脱落,而MPTP+ADF组则显示出空肠绒毛相对完整、排列紧密。肠道菌群测序结果显示, MPTP+AL组相较于NS+AL组,肠道菌群的丰度和多样性显著升高($P<0.001$),而相较于MPTP+ADF组并无显著变化;各组间小鼠的肠道菌群构成具有显著差异,相对物种丰度在科水平的检测结果显示,与NS+AL组相比, MPTP+AL组阿克曼菌科(*Akkermansiaceae*)丰度明显升高($P<0.05$),而MPTP+ADF组相较于MPTP+AL组该科菌的丰度显著下降($P<0.01$)。RT-qPCR检测结果发现,相较于NS+AL组, MPTP+AL组小鼠空肠*Prkaa1* ($P<0.01$)、*Ocln* ($P<0.01$)、*Tjp1* ($P<0.01$)表达水平显著降低,其中, MPTP+ADF组与MPTP+AL组小鼠相比*Prkaa1* ($P<0.01$)和*Tjp1* ($P<0.01$)表达水平均有显著升高, MPTP+ADF组的*Ocln*表达水平也比MPTP+AL组高,但差异无显著性。Western blotting结果显示, ZO-1在MPTP+ADF组小鼠表达水平相较于MPTP+AL组显著上升($P<0.05$)。【结论】隔日禁食对帕金森病模型小鼠空肠屏障具有保护作用,其机制可能与维持肠道菌群阿克曼菌科相对丰度及菌群稳态、提高空肠紧密连接表达有关。

关键词: 帕金森病, 隔日禁食, 肠道屏障, 肠道菌群, 肠紧密连接

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81771384, 81801276)

*Corresponding author: E-mail: shenyanqin@jiangnan.edu.cn

Received: 04-03-2020; Accepted: 27-05-2020; Published online: 30-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(81771384, 81801276)

*通信作者: E-mail: shenyanqin@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-03-04; 接受日期: 2020-05-27; 网络首发日期: 2020-06-30

Protective effect and mechanisms of alternate day fasting on intestinal barrier function in Parkinson's disease model mice

ZHANG Bo-Ping ZHAO Li-Ping SHI Yun HONG Hui ZHOU Yu ZHOU Zhi-Lan
JIA Xue-Bing QIAO Chen-Meng ZHAO Wei-Jiang CUI Chun SHEN Yan-Qin*

Neurodegenerative Diseases and Injury Laboratory, Wuxi Medical School of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: **[Background]** Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder accompanied by gastrointestinal dysfunction and other non-motor symptoms. Intestinal microflora disorder and increased intestinal epithelial permeability are the main factors that affect the function of intestinal barrier. Dietary restriction can improve the composition of intestinal microflora and maintain intestinal epithelial homeostasis. We hypothesize that dietary restriction might have a protective effect on intestinal barrier function in Parkinson's disease model mice and the mechanism might be related to the correction of intestinal microflora disorder and the promotion of intestinal tight junction protein expression. **[Objective]** To investigate the protective effect and its mechanism of alternate day fasting on intestinal barrier in Parkinson's disease model mice. **[Methods]** Thirty-two C57BL/6 mice were randomly divided into normal saline+fed libitum group (NS+AL, n=8), normal saline+alternate day fasting group (NS+ADF group, n=8), MPTP+fed libitum group (MPTP+AL group, n=8) and MPTP+alternate day fasting group (MPTP+ADF group, n=8). We took 48 h as an experimental cycle of the alternate day fasting program, with fasting in the first 24 h and free feeding in the second 24 h. We injected 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) into mice intraperitoneally to build Parkinson's disease model in the 12th–14th cycles (for five consecutive days) of ADF. After the end of the 17th cycle, we collected the feces of mice and detected the changes of intestinal microflora by high-throughput 16S rRNA gene sequencing, then we detected the behavioral test of mice. After collect jejunum tissues of mice, we observed the histopathological changes of intestine by HE staining. We detected mRNA expression levels of AMPK, Occludin and ZO-1 by RT-qPCR (*Prkaa1*, *Ocln*, *Tjp1*), and detected protein expression levels of ZO-1 by Western blotting in tissue. **[Results]** The results of behavioral test showed that compared with NS+AL group, the motor ability of mice in MPTP+AL group decreased significantly ($P<0.01$), while the motor ability of mice in MPTP+ADF group improved ($P<0.01$). HE staining showed that the jejunum villi in the NS+AL group were structurally completed and closely arranged, while the jejunum villi in the MPTP+AL group were broken or even shed. Compared with the MPTP+AL group, the MPTP+ADF group showed that the jejunum villi were intact and closely arranged. Sequencing results of intestinal microflora showed that the abundance and diversity of intestinal microflora in MPTP+AL group were significantly higher than that in NS+AL group ($P<0.001$), while there was no significant change between MPTP+AL group and MPTP+ADF group. There were significant differences in intestinal microflora structure between four groups. The relative species abundance at family level showed that compared with NS+AL group, *Akkermansiaceae* abundance in MPTP+AL group was significantly increased ($P<0.05$), while in MPTP+ADF group this was significantly decreased ($P<0.01$). The results of RT-qPCR showed the expression levels of *Prkaa1* ($P<0.01$), *Ocln* ($P<0.01$), *Tjp1* ($P<0.01$) were significantly decreased in the MPTP+AL group, while the expression levels of *Prkaa1* ($P<0.01$) and *Tjp1* ($P<0.01$) were significantly increased in the MPTP+ADF group. The expression level of *Ocln* in the MPTP+ADF group was also higher than the MPTP+AL group, but the difference was not significant. Western blot results showed ZO-1 expression in MPTP+ADF group was significantly higher than that in MPTP+AL group ($P<0.05$). **[Conclusion]** Alternate day fasting has protective effect on intestinal barrier in Parkinson's disease model mice and the mechanism may be related to maintaining the relative abundance at family level of

Akkermansiaceae and increasing the expression of intestinal tight junctions.

Keywords: Parkinson's disease, Alternate day fasting, Intestinal barrier, Intestinal microflora, Intestinal tight junction

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经系统退行性疾病, 主要神经病理改变为中脑黑质多巴胺能神经元的丢失以及 α -突触核蛋白的异常积累, 其典型的症状为肌肉僵直、动作迟缓等运动功能障碍, 胃肠功能紊乱被认为可能是帕金森病症状的前期阶段^[1-3]。Braak 等^[4]发现肠内存在 α -突触核蛋白的病理沉积, 提示 PD 病理过程是由肠道扩散入脑。

间歇性禁食是利用短期禁食来控制食物摄入频次的饮食限制方式。间歇性禁食不仅有利于肥胖症等代谢性疾病的治疗, 也在认知退化和包括 PD 在内的神经系统退行性疾病中具有一定治疗作用^[5-6]。隔日禁食(alternate day fasting, ADF)是最常见的一种间歇性禁食方案^[7], 研究发现 ADF 可缓解多发性硬化症小鼠的症状, 改善肠道菌群紊乱^[8]。另外, 5 日空腹 2 日进食的间歇性禁食持续 40 d 后, 老年果蝇肠道衰老相关因子表达降低, 屏障功能得到改善, 提示间歇性禁食有利于维持肠上皮细胞活性与肠道屏障稳态^[9]。ADF 已被证明对 PD 模型小鼠具有神经保护作用, 但 ADF 对 PD 模型小鼠肠道屏障功能是否具有保护作用尚无研究报道。

研究证明, 肠道菌群可通过神经、免疫、内

分泌等途径参与肠道与中枢神经系统之间的通讯, 即菌群-肠-脑轴^[10-11]。饮食、药物、生活方式等因素均可引起肠道菌群的紊乱, 不仅改变肠道黏液层的生理功能, 继而出现肠屏障功能障碍^[12-13], 而且还会影响脑正常功能, 诱导行为异常与认知障碍^[14]。近年来, 许多研究证实肠道菌群失调与中枢神经系统疾病的发生发展密切相关^[15]。认知能力受损的阿尔茨海默症患者体内拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)的丰度显著升高^[16]。多发性硬化症患者肠道菌群结构改变, 厚壁菌门(*Firmicutes*)的丰度较对照组显著下降, 与炎症介导脱髓鞘相关^[17]。自闭症模型小鼠肠道菌群改变, 常伴有肠通透性增强等胃肠道异常, 给予脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)治疗可有效改善^[18]。同样, PD 患者粪便中检测到肠道菌群也存在失调现象, 肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)丰度增高, 其表达水平与 PD 患者运动障碍的严重程度成正相关^[19]。值得关注的是, 艾克曼菌属(*Akkermansia*)相较对照组丰度增加, 该菌群的增加与肠黏液层降解有关^[20] (表 1)。因此, 本文对 PD 模型小鼠肠道菌群的变化、ADF 对 PD 模型小鼠肠道菌群失调的影响进行验证与探索。

表 1 中枢神经系统疾病与肠道菌群失调

Table 1 Central nervous system diseases and disorder of intestinal microflora

疾病	菌群的变化	相关症状	参考文献
Disease	Altered microflora	Associated symptoms	References
阿尔茨海默症	双歧杆菌属 \uparrow <i>Bifidobacterium</i> \uparrow	与认知障碍相关	[16]
Alzheimer's disease	拟杆菌门 \uparrow <i>Bacteroidetes</i> \uparrow	Cognitive disorder	
多发性硬化症	厚壁菌门 \downarrow <i>Firmicutes</i> \downarrow	与炎症脱髓鞘相关	[17]
Multiple sclerosis		Inflammatory demyelinating	
自闭症	脆弱拟杆菌 \downarrow <i>Bacteroides fragilis</i> \downarrow	与焦虑、胃肠道屏障缺陷相关	[18]
Autism spectrum disorder		Anxiet, intestinal barrier dysfunction	
帕金森病	肠杆菌科 \uparrow <i>Enterobacteriaceae</i> \uparrow	与运动障碍严重程度正相关	[19]
Parkinson's disease		Dyscinesia	
帕金森病	艾克曼菌 \uparrow <i>Akkermansia</i> \uparrow	与肠黏液层降解相关	[20]
Parkinson's disease		Intestinal mucous layer degradation	

注: \uparrow : 相对丰度升高; \downarrow : 相对丰度降低。

Note: \uparrow : Relative abundance increases; \downarrow : Relative abundance decrease.

紧密连接蛋白也是肠道屏障的重要组成部分,对维持肠道上皮完整性至关重要^[21]。临床研究发现 PD 患者肠道中闭合蛋白 Occludin 表达水平下降以及肠上皮通透性增高^[22]。此外,研究发现肠道屏障的完整性与肠道能量状态有关^[23]。小肠往往需要更高的 ATP 来保证肠上皮完整性^[23]。另外,AMP 依赖蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)是胃肠生长素释放肽——胃饥饿素的靶标,可在 PD 中发挥神经保护功能^[24]。激活的 AMPK 是否参与 ADF 对 PD 小鼠肠屏障的作用,本文也将进行进一步研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

神经毒素 MPTP,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂,上海碧云天生物技术公司; β -tubulin 抗体,武汉三鹰生物技术有限公司;ZO-1 抗体,武汉爱博泰克生物科技有限公司;PVDF 膜,密理博(中国)有限公司;RT-qPCR 引物和 Trizol 试剂,Invitrogen 公司;氯仿、异丙醇,上海国药化学试剂有限公司;反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT Master Mix 和荧光定量试剂盒 SYBR Premix ExTaqTM II,宝生物工程(大连)有限公司;QuantiFluorTM-ST 蓝色荧光定量系统,普洛麦格(北京)生物技术有限公司;HE 染色试剂盒,北京索莱宝科技有限公司。杯式超声波细胞破碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;荧光定量 PCR 仪,罗氏(中国)有限公司;电泳仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;半自动石蜡切片机,莱卡显微系统(上海)贸易有限公司。

1.2 实验设计与分组

SPF 级别 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司,SPF 级小鼠鼠粮购于上海普路腾生物科技有限公司。实验前 C57BL/6 小鼠放于检疫环境适应一周,给予小鼠 12 h 为周期的光暗循环,保持室温在 24 ± 2 °C,空气湿度在

$55\%\pm 10\%$ 。将 32 只小鼠随机分为 4 组,每组 8 只小鼠。NS+AL 组小鼠自由摄食饮水,腹腔注射生理盐水;NS+ADF 组小鼠隔日禁食自由饮水,腹腔注射生理盐水;MPTP+AL 组小鼠自由摄食饮水,腹腔注射 MPTP;MPTP+ADF 组小鼠隔日禁食自由饮水,腹腔注射 MPTP 神经毒素。以 48 h 为一个饮食周期,前 24 h 采取禁食,后 24 h 采取自由摄食,重复进行 17 个循环周期。每个循环期末记录本循环小鼠食物摄入量。在第 12-14 个周期进行腹腔注射 MPTP (单次剂量 30 mg/kg,每天一次,连续注射 5 d),建立亚急性帕金森病小鼠模型。所有试验步骤均得到江南大学实验动物伦理委员会的批准。

1.3 行为学测试

爬杆实验:小鼠所用爬杆是直径 1 cm、高 55 cm 的金属杆,顶部有一直径约 2 cm 的金属小球,金属杆外包裹一层纱布防止打滑。测试时手执小鼠尾尖端,使小鼠头下尾上接触金属小球,小鼠两后肢接触金属球开始计时,记录小鼠自上而下爬完全杆的时间。测试 3 次取平均值。

悬挂试验:小鼠两前肢置于距地约 30 cm、直径约为 0.5 cm 的金属线上,抓其尾部向下放,如两后肢均可抓住金属线,记 4 分;如一后肢可抓住金属线,记 3 分;如两前肢抓住金属线,记 2 分;如只有一只前肢可抓住金属线,记 1 分;掉落,计 0 分。

1.4 样品采集

试验周期结束后,采集小鼠新鲜粪便,置于 -80 °C 保存,用于后续肠道菌群测序。收取 6 只小鼠空肠组织,置于 -80 °C 保存,以备后续 RT-qPCR 和 Western blotting 检测使用;收取 2 只小鼠空肠组织,置于 4%的多聚甲醛中 4 °C 保存,以备后续 HE 染色使用。

1.5 HE 染色观察病理形态变化

石蜡切片 $4\ \mu\text{m}$,经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水、苏木精染核、盐酸酒精分化后返蓝,进行伊红染

色, 用中性胶固封后, 使用数字扫描仪拍摄图像。

1.6 肠道菌群基因组抽提与测序

肠道菌群基因组 DNA 抽提后, 利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA。16S rRNA 基因扩增区域为 V3-V4, 引物序列为 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3')。PCR 反应体系 (25 μ L): 待扩增基因组 DNA 11.5 μ L, 2 \times KAPA HiFi HotStart Ready Mix 12.5 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 参照电泳初步定量结果, 再将 PCR 产物用 QuantiFluorTM-ST 蓝色荧光定量系统进行检测定量, 之后按照测序要求进行相应比例混合, 最后使用 TruSeq 进行文库构建, 经测序后以 97% 的一致性将序列聚类为操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。

1.7 RT-qPCR 检测小鼠空肠 AMPK、ZO-1、Occludin 的 mRNA 变化

称取 20 mg 空肠组织, 加入 500 μ L Trizol, 45 W 超声破碎 50 s (工作 20 s, 间歇 10 s) 后, 加入 100 μ L 氯仿, 振荡混匀后室温静置 10 min, 4 $^{\circ}$ C、11 300 r/min 离心 15 min, 取上层水相加入 250 μ L 异丙醇, 混匀后室温静置 10 min, 4 $^{\circ}$ C、11 300 r/min 离心 10 min, 弃上清, 再分别经 75% 乙醇和无水乙醇清洗后离心 10 min 得到空肠总

RNA 并测定浓度, 使用 PrimeScriptTM RT Master Mix 试剂盒进行反转录, 得到 cDNA, 以该 cDNA 为模板, 使用 SYBR Premix Ex TaqTM II 进行 RT-qPCR 反应, 使用的引物有 *Prkaa1*、*Tjp1*、*Ocln* 和 *Gapdh*, 文中用于 RT-qPCR 的引物序列来源于检索 NCBI 基因数据库, 通过基因 ID 在 Primer Bank 中获得相关引物序列, 详见表 2。

1.8 Western blotting 检测小鼠空肠 ZO-1 的表达

称取 20 mg 肠组织, 加入 RIPA 裂解液 200 μ L, 加入蛋白酶抑制剂 2 μ L, 于匀浆机中研磨匀浆, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 15 min 后取上清。经聚氨基丙烯酸正丁酯 Bicinchoninic acid (BCA) 法检测蛋白浓度后进行 Western blotting 实验。一抗 ZO-1 (1:1 000)、 β -tubulin (1:5 000), HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗 (1:5 000)、HRP 标记羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:5 000)。

1.9 统计方法

使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 多组之间的分析使用单因素方差分析, 数据以 Mean \pm SEM 表示, 将 $P < 0.05$ 设定为显著性阈值 (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)。

2 结果与分析

2.1 ADF 影响小鼠食物摄入量

为了解 ADF 对小鼠食物摄入量的影响, 在 ADF 每个循环进食日记录小鼠的食物摄入量以及摄入总量。

表 2 引物信息表

Table 2 The primer information

基因 ID 号	基因名称	引物序列
Gene ID	Gene name	Primers sequence (5'→3')
21872	Zonula occludens-1 (<i>Tjp1</i>)	(F) GAGCGGGCTACCTTACTGAAC (R) GTCATCTCTTCCGAGGCATTAG
18260	Occludin (<i>Ocln</i>)	(F) CTGGATCTATGTACGGCTCACA (R) TCCACGTAGAGACCAGTACCT
105787	AMP-activated protein kinase (<i>Prkaa1</i>)	(F) ATCCCTTCCGGTGTGGATTATTG (R) CAAGCAGGACGTTCTCAGGT
14433	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>Gapdh</i>)	(F) AGGTCGGTGTGAACGGATTGT (R) TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

小鼠食物摄入量在每个 ADF 循环中进食日的结果显示, ADF 组小鼠食物摄入量的均值比 AL 组小鼠显著升高($P<0.001$), 几乎是 AL 组小鼠摄食量的 2 倍, 如图 1A 所示。小鼠食物摄入总量显示, 与对照组相比, ADF 对 AL 组小鼠的摄食总量均无显著影响($P>0.05$), 如图 1B 所示。各组小鼠进食日摄食量与总摄食量统计表详见表 3。

2.2 ADF 改善 PD 模型小鼠运动功能障碍

为了验证帕金森模型小鼠的建立以及探究 ADF 对 PD 模型小鼠运动能力的影响, 通过悬挂试验与爬杆实验分别检测小鼠的肌肉力量以及动作的迟缓程度来综合评价小鼠的运动能力。

悬挂实验结果显示, MPTP+AL 组小鼠得分相较于 NS+AL 组小鼠显著降低($P<0.01$), 而 MPTP+ADF 组得分较 MPTP+AL 组小鼠显著升高($P<0.001$), 如图 2A 所示。爬杆实验结果显示, 与 NS+AL 组相比, MPTP+AL 组小鼠所用的时间明显

延长($P<0.01$), 而 MPTP+ADF 组小鼠较 MPTP+AL 组所用时间显著下降($P<0.001$), 如图 2B 所示。通过行为学结果, 一方面证明 PD 模型小鼠模型成功构建; 另一方面证明 ADF 饮食方案能够改善 PD 模型小鼠运动迟缓与肢体力量不足等运动功能障碍。此外, ADF 对于正常小鼠的运动能力没有显著的影响。

2.3 ADF 改善 PD 模型小鼠空肠病理组织学变化

组织的病理改变通常反映功能的变化。为了探究 ADF 对 PD 模型小鼠空肠病理组织学变化的影响, 通过 HE 染色观察空肠绒毛形态学改变。

HE 染色结果显示, NS+AL 组小鼠的空肠绒毛上皮结构完整, 排列整齐, 连接紧密, 如图 3A 所示。然而 MPTP+AL 组小鼠空肠绒毛上皮结构破损, 连接断裂, 出现水肿, 如图 3C 所示。相较于 MPTP+AL 组, MPTP+ADF 组中小鼠肠绒毛结构完整性有所恢复, 排列密集较为整齐, 如图 3D

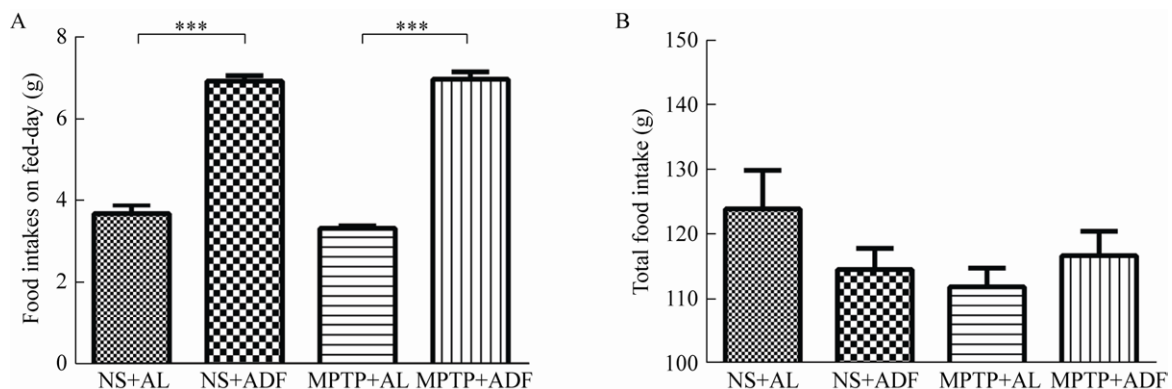


图 1 各组小鼠摄食量

Figure 1 Food intake of mice in various groups

注: A: 进食日摄食量; ***, $P<0.001$. B: 总摄食量. $n=8$.

Note: A: Food intake on fed-day; ***, $P<0.001$. B: Total food intake. $n=8$.

表 3 各组小鼠进食日摄食量与总摄食量统计表

Table 3 Statistical table of food intake on fed-day and total food intake in various group

摄食量 Food intake	组别 Groups				P 值 P value	
	NS+AL (NA)	NS+ADF (NF)	MPTP+AL (MA)	MPTP+ADF (MF)	NA vs. NF	MA vs. MF
进食日 Fed-day (g)	3.68±0.37	6.93±0.33	3.32±0.11	6.97±0.45	0.000***	0.000***
总计 Total (g)	123.90±10.29	114.52±5.68	111.84±5.01	116.67±6.51	0.43	0.84

Note: ***, $P<0.001$.

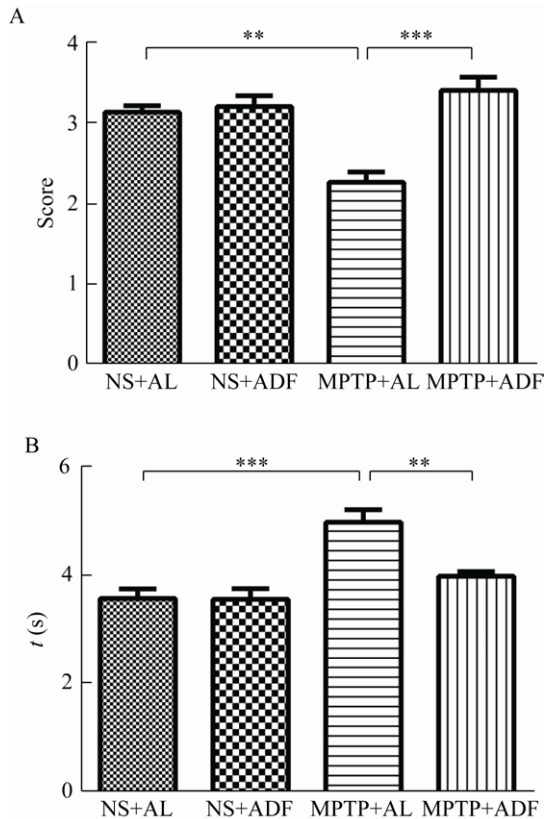


图2 各组小鼠行为学测试

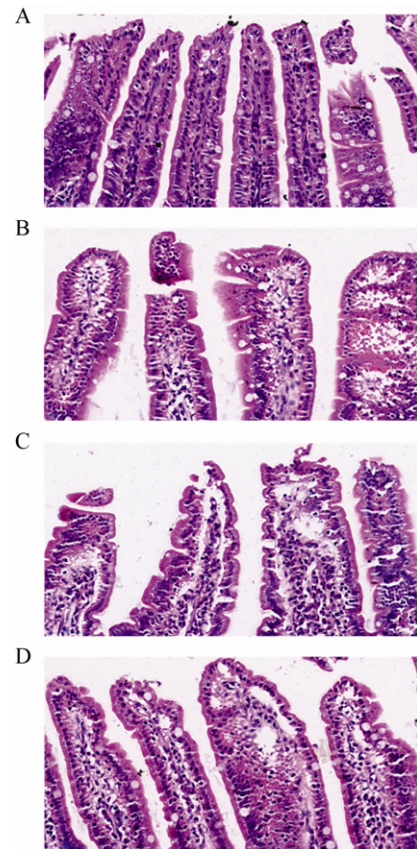
Figure 2 Behavior test in various groups

注: A: 悬挂试验; B: 爬杆实验; n=8. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.
 Note: A: Traction test; B: Pole test; n=8. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

所示。上述结果说明, ADF对PD模型小鼠空肠绒毛形态的完整有一定保护作用。

2.4 ADF影响PD模型小鼠肠道菌群构成

基于 α 多样性和 β 多样性对比分析,从菌群丰度多样性和菌群群落结构两方面进行系统评价。Chao1指数是反映菌群丰度的 α 多样性之一,结果显示, MPTP+AL组小鼠的Chao1指数较NS+AL组小鼠有显著上升趋势($P < 0.001$),说明MPTP诱导的PD模型小鼠肠道菌群丰度和多样性更高,而MPTP+ADF组与MPTP+AL组小鼠并无显著差异,如图4A所示。非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling analysis, NMDS)是 β 多样性分析的方法之一, NMDS图中的每个点表示一个样品,点与点之间的距离表示差异程度,同组的

图3 各组小鼠空肠绒毛组织病理形态(HE染色, 40 \times)**Figure 3 Pathological morphology of mice jejunum villi in various groups (by HE staining, 40 \times)**

注: A: NS+AL组; B: NS+ADF组; C: MPTP+AL组; D: MPTP+ADF组。肠绒毛是肠壁向肠腔伸出指状突起的肠组织,外覆单层柱状上皮,中间为固有层。图中深蓝色圆点状结构部分为细胞核,紫红色染色部分为细胞质,期间空泡样结构为杯状细胞。

Note: A: NS+AL group; B: NS+ADF group; C: MPTP+AL group; D: MPTP+ADF group. Intestinal villi is the tissue with fingerlike protruding from the intestinal wall to the lumen. In this figure, the dot structure stained in the dark blue is nucleus, cytoplasm is stained in the purplish red, and the vacuole-like structure is goblet cells.

样品使用同一种颜色表示, Stress 越小(< 0.2),说明NMDS越可以准确反映样品间的差异程度。Adonis分析用来判断分组因素对样本差异的解释度。基于Bray-Curtis距离分析结果显示, NS+AL、NS+ADF、MPTP+AL、MPTP+ADF组小鼠在菌落结构上形成明显的聚类(stress=0.061),通过ANOSIM的方法对4组小鼠菌群聚类进行分析发现差异具有显著性($P < 0.01$),如图4B所示。

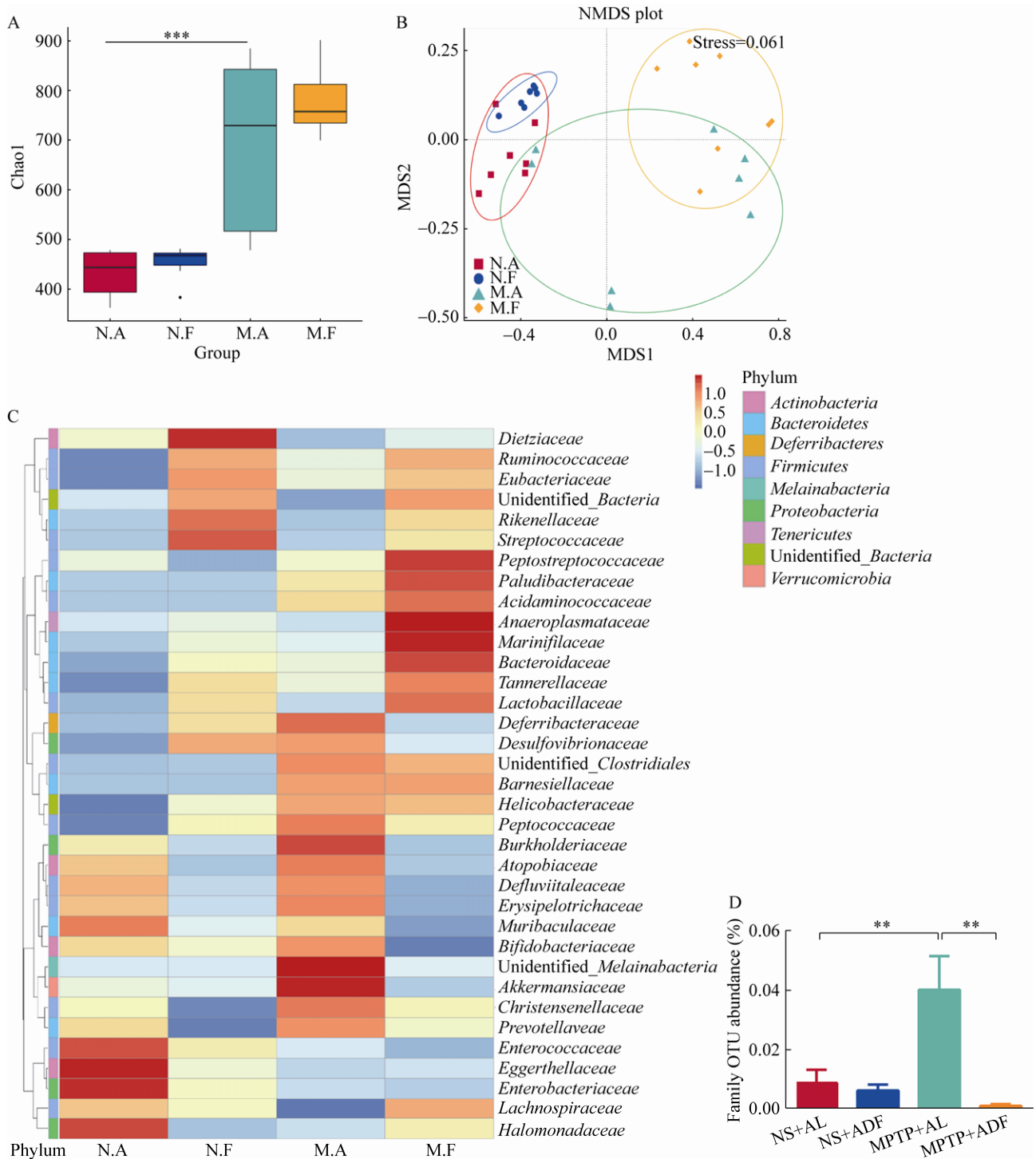


图 4 ADF 影响 PD 模型小鼠肠道菌群的构成

Figure 4 ADF affected the composition of intestinal microflora in PD model mice

注: A: 肠道菌群 α 多样性; B: 肠道菌群 β 多样性; C: 基于 OTU 聚类物种科水平热图; D: 艾克曼菌科相对丰度; N.A: NS+AL 组(n=7); N.F: NS+ADF 组(n=7); M.A: MPTP+AL 组(n=8); M.F: MPTP+ADF 组(n=8). **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Note: A: Alpha diversity of intestinal microflora; B: Beta diversity of intestinal microflora; C: Based on OTU clustering species abundance heat map at family level; D: Relative abundance at family level of *Akkermansiaceae*; N.A: NS+AL group (n=7); N.F: NS+ADF group (n=7); M.A: MPTP+AL group (n=8); M.F: MPTP+ADF group (n=8). **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

物种相对丰度聚类热图是在科水平不同菌群间的相对丰度差异以及菌群分布构成。结果显示: 相比NS+AL组, MPTP+AL组小鼠菌群相对丰度有所改变。脱铁杆菌科(*Deferribacillaceae*)、螺杆菌科(*Helicobacteraceae*)、丹毒丝菌科(*Erysipelotrichaceae*)等相对丰度均在PD模型小鼠中有所上升, 在MPTP+ADF组有下降趋势, 统计学上并无显著差异。其中, 艾克曼菌科相对丰度在MPTP+AL组小鼠中显著上升($P<0.01$), 而在MPTP+ADF组小鼠艾克曼菌科相对丰度显著下降($P<0.01$), 如图4C、4D所示。菌群测序的结果表明, PD模型小鼠肠道菌群发生变化, 而ADF可以纠正艾克曼菌科丰度的异常升高。

2.5 ADF激活 *Prkaa1* 及升高PD模型小鼠空肠上皮紧密连接 *Ocln* 的表达水平

为了探究ADF对PD模型小鼠空肠能量代谢分子和肠道紧密连接分子的影响, 通过RT-qPCR的方法检测 *Prkaa1* 以及 *Ocln* 表达水平的变化。

小鼠空肠 mRNA 数据显示, 与NS+AL组小鼠相比, MPTP+AL组小鼠 *Prkaa1* 表达水平显著下降($P<0.01$), 而与MPTP+AL组相比, MPTP+ADF组小鼠 *Prkaa1* 分子的表达明显升高($P<0.01$), 如

图5A所示。与NS+AL组小鼠相比, MPTP+AL组小鼠空肠的 *Ocln* 明显降低($P<0.01$), MPTP+ADF组小鼠空肠 *Ocln* 有上升的趋势, 但没有显著性差异, 如图5B所示。上述结果说明, ADF激活PD小鼠肠道内能量代谢, 可能会促进PD小鼠肠紧密连接的修复。

2.6 ADF缓解PD模型小鼠空肠上皮紧密连接ZO-1的丢失

为探究ADF对PD模型小鼠肠紧密连接ZO-1的影响, 通过RT-qPCR和Western blotting的方法检测肠紧密连接蛋白ZO-1的表达水平。

RT-qPCR结果显示, 在mRNA水平, 与NS+AL组相比, MPTP+AL组小鼠空肠的 *Tjp1* 呈现出显著的降低($P<0.01$), 而MPTP+ADF组ZO-1的表达比MPTP+AL组明显上升($P<0.01$), 如图6A所示。Western blotting的结果显示, MPTP+AL组相较于NS+AL组小鼠, ZO-1也呈现降低趋势, 但与NS+AL组小鼠相比并无统计学意义, 然而MPTP+ADF组相比MPTP+AL组ZO-1的表达明显升高($P<0.05$), 如图6B所示。上述结果表明, ADF可能对PD疾病条件下ZO-1的丢失有更显著的缓解作用。

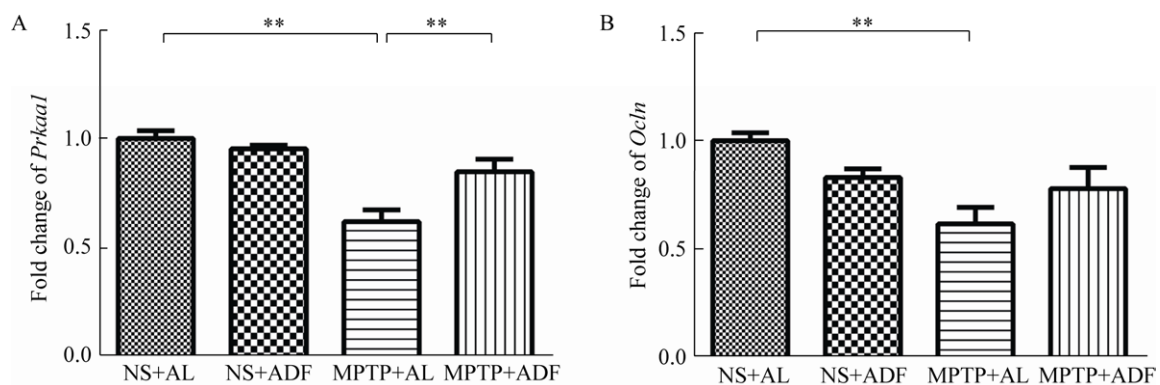


图5 ADF促进PD模型小鼠空肠 *Prkaa1* 和 *Ocln* 表达水平

Figure 5 ADF improve the expression levels of *Prkaa1* and *Ocln* in jejunum of PD model mice

注: A: RT-qPCR 检测 *Prkaa1* 的表达水平; B: RT-qPCR 检测 *Ocln* 的表达水平; n=6. **: $P<0.01$.

Note: A: Detected *Prkaa1* expression in jejunum by RT-qPCR; B: Detected *Ocln* expression in jejunum by RT-qPCR; n=6. **: $P<0.01$.

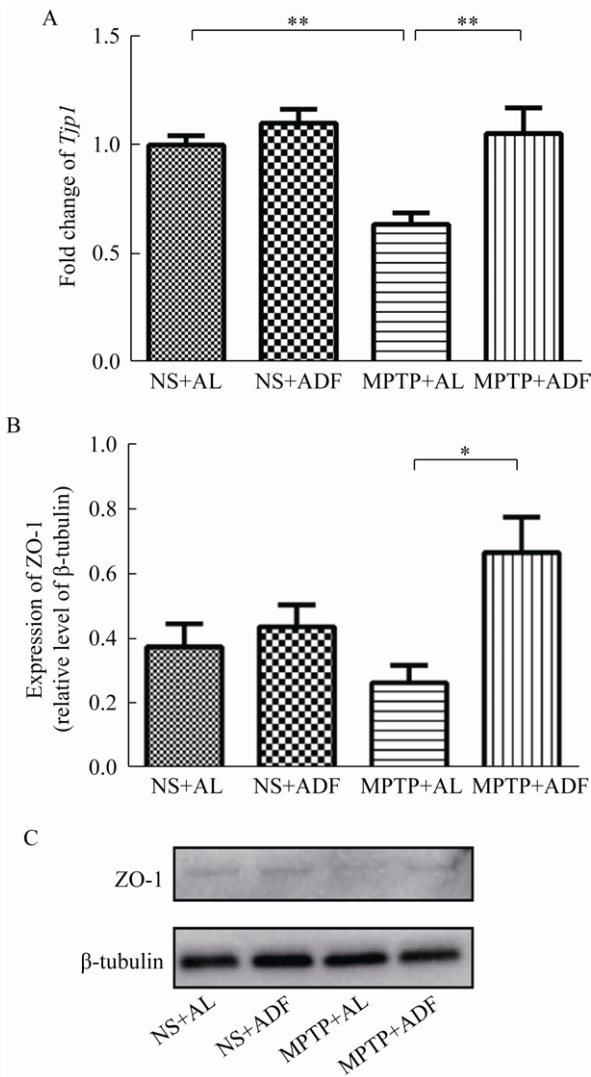


图 6 ADF 缓解 PD 模型小鼠空肠 ZO-1 的丢失
Figure 6 ADF alleviat the loss of ZO-1 in jejunum of PD model mice

注: A: RT-qPCR 检测 *Tjp1* 的表达水平(n=6); B、C: Western blotting 检测 ZO-1 的表达水平(n=4)。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。
 Note: A: Detected *Tjp1* expression in jejunum by RT-qPCR (n=6); B, C: Detected ZO-1 expression in jejunum by western blotting (n=4)。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

3 讨论与结论

本研究选择 ADF 作为饮食限制的研究方式,发现 ADF 组小鼠进食日的食物摄入量显著高出 AL 组小鼠,但是 17 个循环末总摄食量保持相近水平,这表明 ADF 对肠道屏障功能的保护作用并非由于摄食量的减少,而是摄食频次的周期性

变化。

小鼠行为学实验中 PD 模型小鼠运动能力下降,一方面证明 PD 模型构建成功,另一方面证明 ADF 显著改善了 PD 模型小鼠运动功能障碍,这与以往 ADF 对 PD 具有神经保护作用的研究结果一致^[25]。值得关注的是,本研究首次发现 PD 模型小鼠空肠绒毛组织出现断裂、破损和水肿,肠绒毛上皮细胞的完整性遭到破坏,而 ADF 在一定程度上可以修复 PD 模型小鼠受损的空肠绒毛形态结构,说明 ADF 对 PD 模型小鼠肠道屏障具有保护作用。

艾克曼菌属位于肠道黏液层,通过降解黏液层粘蛋白获得能量^[26]。其中,嗜粘蛋白-艾克曼菌(*Akkermansia muciniphila*)是一株严格厌氧菌,其已被证实可通过修复黏液层,在高脂喂养诱导的肥胖模型小鼠体内逆转其肠道病理变化,改善肠道屏障功能^[27];然而,在高血红素铁膳食诱导下的小鼠肠道中 *A. muciniphila* 的相对丰度显著升高,其黏液层却有一定损伤^[28]。临床研究发现 PD 患者肠道菌群中艾克曼菌属表达水平升高^[29-30]。本研究在 PD 模型小鼠体内检测到艾克曼菌科的相对丰度较正常小鼠显著升高。推测倍增的艾克曼菌属过量消耗粘蛋白,促使黏液层变薄,肠屏障功能受到损伤^[31]。研究发现,禁食节律引起肠道菌群的周期性变化有助于肠道菌群的构成改变^[32]。本研究发现 ADF 可有效阻止艾克曼菌科在 PD 模型小鼠肠道中的异常升高,这提示 ADF 对 PD 模型小鼠肠屏障功能的保护作用与调节肠道菌群紊乱有关,艾克曼菌科可能发挥关键作用。目前,尚无法确定艾克曼菌科中发挥关键作用的有益菌株,这也是未来值得研究与讨论的重点。

Claudin 蛋白家族为跨膜的紧密连接蛋白,参与紧密连接的屏障功能和跨膜转运功能^[33]。研究发现,PD 患者结肠上皮紧密连接蛋白 Occludin 下降^[22,34],本研究中首次检测到由 MPTP 诱导的 PD 模型小鼠空肠中 Occludin 的表达水平显著下降,而

ADF 对 PD 模型小鼠空肠 Occludin 的表达有一定恢复作用。ZO 蛋白家族是膜外周蛋白^[35], 主要参与肠道屏障信号传导、细胞增殖与分化、免疫调节和上皮细胞极性形成等过程^[36]。AMPK 在钙开关诱导的 ZO-1 组装期间被激活, 增强紧密连接组装^[37], 并且促进上皮分化与细胞极性的建立^[38]。本次研究中关注到 ZO-1 的表达水平在 PD 模型小鼠空肠中显著下降, 而 ADF 可以挽救 PD 模型小鼠空肠 ZO-1 的丢失; 同时也发现, ADF 激活 PD 模型小鼠空肠中 *Prkaa1* 的表达。这些结果提示 ADF 可能通过激活 AMPK, 促进 PD 模型小鼠肠紧密连接的表达, 修复受损的肠屏障功能。

综上所述, 本文首次发现 ADF 对 PD 模型小鼠肠道屏障的保护作用, 探索其机制可能与维持肠道菌群中艾克曼菌科相对丰度及肠内环境稳态、提高肠紧密连接的表达有关。接下来, 我们需要深入探究饮食节律对肠道屏障的保护作用机制, 这将为预防和治疗帕金森病提供更广的思路。

REFERENCES

- [1] Shannon KM, Keshavarzian A, Dodiya HB, et al. Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's disease? Evidence from 3 cases[J]. *Movement Disorders*, 2012, 27(6): 716-719
- [2] Tereshchenko LV, Anisimov VN, Shul'govsky VV, et al. Early changes in saccadic eye movement in hemiparkinsonian MPTP-treated monkeys[J]. *Perception*, 2015, 44(8/9): 1054-1063
- [3] Sun MF, Shen YQ. Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's disease[J]. *Ageing Research Reviews*, 2018, 45: 53-61
- [4] Braak H, de Vos RAI, Bohl J, et al. Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology[J]. *Neuroscience Letters*, 2006, 396(1): 67-72
- [5] Anton S, Leeuwenburgh C. Fasting or caloric restriction for healthy aging[J]. *Experimental Gerontology*, 2013, 48(10): 1003-1005
- [6] Amigo I, Kowaltowski AJ. Dietary restriction in cerebral bioenergetics and redox state[J]. *Redox Biology*, 2014, 2: 296-304
- [7] Tinsley GM, la Bounty PM. Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans[J]. *Nutrition Reviews*, 2015, 73(10): 661-674
- [8] Cignarella F, Cantoni C, Ghezzi L, et al. Intermittent fasting confers protection in CNS autoimmunity by altering the gut microbiota[J]. *Cell Metabolism*, 2018, 27(6): 1222-1235.E6
- [9] Catterson JH, Khericha M, Dyson MC, et al. Short-term, intermittent fasting induces long-lasting gut health and TOR-independent lifespan extension[J]. *Current Biology*, 2018, 28(11): 1714-1724.e4
- [10] Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2015, 125(3): 926-938
- [11] Valles-Colomer M, Falony G, Darzi Y, et al. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(4): 623-632
- [12] Jakobsson HE, Rodríguez-Piñeiro AM, Schütte A, et al. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier[J]. *EMBO Reports*, 2015, 16(2): 164-177
- [13] Liu SR, da Cunha AP, Rezende RM, et al. The host shapes the gut microbiota via fecal microRNA[J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 19(1): 32-43
- [14] Bercik P, Denou E, Collins J, et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(2): 599-609.E3
- [15] Schmidt C. Mental health: thinking from the gut[J]. *Nature*, 2015, 518(7540): S12-S14
- [16] Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 13537
- [17] Joscelyn J, Kasper LH. Digesting the emerging role for the gut microbiome in central nervous system demyelination[J]. *Multiple Sclerosis Journal*, 2014, 20(12): 1553-1559
- [18] Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders[J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1451-1463
- [19] Scheperjans F, Aho V, Pereira PAB, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype[J]. *Movement Disorders*, 2015, 30(3): 350-358
- [20] Scheperjans F. The prodromal microbiome[J]. *Movement Disorders*, 2018, 33(1): 5-7
- [21] Molendijk I, van der Marel S, Maljaars PWJ. Towards a food pharmacy: immunologic modulation through diet[J]. *Nutrients*, 2019, 11(6): 1239
- [22] Fang X. Impaired tissue barriers as potential therapeutic targets for Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Metabolic Brain Disease*, 2018, 33(4): 1031-1043
- [23] Wang XY, Liu YL, Li S, et al. Asparagine attenuates intestinal injury, improves energy status and inhibits AMP-activated protein kinase signalling pathways in weaned piglets challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide[J]. *British Journal of Nutrition*, 2015, 114(4): 553-565

- [24] Bayliss JA, Lemus MB, Stark R, et al. Ghrelin-AMPK signaling mediates the neuroprotective effects of calorie restriction in Parkinson's disease[J]. *Journal of Neuroscience*, 2016, 36(10): 3049-3063
- [25] Duan WZ, Mattson MP. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 1999, 57(2): 195-206
- [26] Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28032
- [27] Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(22): 9066-9071
- [28] Ijssennagger N, Belzer C, Hooiveld GJ, et al. Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(32): 10038-10043
- [29] Pellegrini C, Antonioli L, Colucci R, et al. Interplay among gut microbiota, intestinal mucosal barrier and enteric neuro-immune system: a common path to neurodegenerative diseases?[J]. *Acta Neuropathologica*, 2018, 136(3): 345-361
- [30] Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, et al. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome[J]. *Movement Disorders*, 2017, 32(5): 739-749
- [31] Ganesh BP, Klopffleisch R, Loh G, et al. Commensal *Akkermansia muciniphila* exacerbates gut inflammation in *Salmonella typhimurium*-infected gnotobiotic mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74963
- [32] Patterson RE, Sears DD. Metabolic effects of intermittent fasting[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2017, 37: 371-393
- [33] Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM. Transmembrane proteins in the tight junction barrier[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1999, 10(6): 1337-1345
- [34] Sikiric P, Rotkvic I, Mise S, et al. Dopamine agonists prevent duodenal ulcer relapse: a comparative study with famotidine and cimetidine[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 1991, 36(7): 905-910
- [35] González-Mariscal L, Quirós M, Díaz-Coránguez M. ZO proteins and redox-dependent processes[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 15(5): 1235-1253
- [36] Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 741-754
- [37] Zhu MJ, Sun XF, Du M. AMPK in regulation of apical junctions and barrier function of intestinal epithelium[J]. *Tissue Barriers*, 2018, 6(2): 1-13
- [38] Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2018, 50(8): 103