

鞣花酸对 *APP/PS1* 双转基因小鼠结肠 ZO-1、Claudin-1 蛋白表达及肠道菌群多样性的影响

刘 鑫¹, 冯小丽¹, 杨丕佳¹, 刘 洋¹, 仲丽丽^{2*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 探讨鞣花酸对阿尔茨海默病(AD)治疗的可能作用机制。**方法** 取 24 只 SPF 级 *APP/PS1* 双转基因小鼠随机分为模型组、石杉碱甲(0.1 mg·kg⁻¹)组和鞣花酸高、低剂量(50、20 mg·kg⁻¹)组, 每组 6 只, 另外选取 6 只 SPF 级 3 月龄 C57BL/6J 野生型小鼠作为对照组, 连续 ig 给药 60 d。采用 Morris 水迷宫实验观察各组小鼠的空间学习记忆能力, 各组随机处死后通过苏木精-伊红(HE)染色观察结肠组织形态, 免疫组化分析紧密连接蛋白 1(ZO-1)、Claudin-1 蛋白的表达, 16S rRNA 测序检测各组小鼠肠道菌群多样性和优势物种分布情况。**结果** 在定位巡航实验中, 与对照组比较, 模型组逃避潜伏期延长($P<0.01$); 与模型组比较, 鞣花酸高、低剂量组和石杉碱甲组逃避潜伏期明显缩短($P<0.01$)。在空间探索实验中, 模型组小鼠在平台象限内的停留时间和穿越平台的次数较对照组均显著减少($P<0.01$); 石杉碱甲组和鞣花酸低、高剂量组的小鼠在平台象限内停留时间较模型组小鼠均显著延长($P<0.01$), 穿越平台的次数显著增加($P<0.05$ 、 0.01)。与对照组相比, 模型组和低剂量鞣花酸组的结肠组织形态差异较大; 石杉碱甲组和高剂量鞣花酸组结肠组织形态差异较小。对照组 ZO-1、Claudin-1 蛋白表达强阳性, 与对照组相比, 模型组表达量显著下降($P<0.01$); 与模型组相比, 石杉碱甲组和鞣花酸组表达量显著上升($P<0.01$)。模型组小鼠的菌群丰度和多样性明显低于对照组小鼠, 经高剂量鞣花酸处理的 AD 小鼠菌群丰度和多样性的缺陷均有所改善。与对照组相比, AD 模型小鼠拟杆菌门丰度显著降低, 厚壁菌门、促炎相关变形菌门丰度异常升高; 经鞣花酸干预后, 失衡的厚壁菌门、拟杆菌门丰度得到有效回调, 变形菌门丰度显著下降。在属水平上, 模型组乳杆菌属本底丰度已上升; 经鞣花酸干预后, 促炎相关杜氏杆菌属丰度降低, 同时乳杆菌属、异普氏菌属丰度进一步升高。**结论** 鞣花酸可以通过调节紧密蛋白的表达, 增强肠道的屏障功能, 降低肠道通透性, 改善肠道生态结构, 对 AD 发挥改善作用。

关键词: 鞣花酸; 阿尔茨海默病; *APP/PS1* 双转基因小鼠; 微生物群-肠-脑轴; 肠道菌群

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)08-2709-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.08.008

Effects of ellagic acid on colonic ZO-1 and Claudin-1 protein expression and gut microbiota diversity in *APP/PS1* transgenic mice

LIU Xin¹, FENG Xiaoli¹, YANG Pijia¹, LIU Yang¹, ZHONG Lili²

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To explore the possible mechanism of ellagic acid in treatment of Alzheimer's disease (AD). **Method** Twenty-four SPF-grade *APP/PS1* double-transgenic mice were randomly divided into four groups: Model group, huperzine A (0.1 mg·kg⁻¹) group, and high- and low-dose ellagic acid groups (20, 50 mg·kg⁻¹), with six mice in each group. Additionally, six SPF-grade 3-month-old C57BL/6J wild-type mice were selected as the control group. All groups received intragastric administration for 60 consecutive days. Spatial learning and memory abilities were assessed using the Morris water maze test. After random sacrifice, colonic tissue

收稿日期: 2026-03-13

基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2022H068); 中国博士后科学基金资助课题(2015M581496); 黑龙江中医药大学研究生创新科研项目(2022yjsx012, 2019yjsx011, 2024yjsx027); 黑龙江省卫生健康委科研课题(20220202080996); 黑龙江省中医药科研课题(ZHY2025-180)

作者简介: 刘 鑫, 研究方向为中医药抗肿瘤以及阿尔茨海默病治疗。E-mail: 1714400286@qq.com

***通信作者:** 仲丽丽 E-mail: zhll1979@126.com

morphology was examined by hematoxylin-eosin (HE) staining, expression of tight junction proteins ZO-1 and Claudin-1 was analyzed via immunohistochemistry, and intestinal microbiota diversity and dominant species distribution were evaluated by 16S rRNA sequencing. **Results** In the place navigation test, compared to the control group, the escape latency in the model group was significantly prolonged ($P < 0.01$); Compared to the model group, escape latency was significantly shortened in both the high- and low-dose ellagic acid groups and the huperzine A group ($P < 0.01$). In the spatial probe test, the time spent in the target quadrant and the number of platform crossings were significantly reduced in the model group compared to the control group ($P < 0.01$). The time spent in the target quadrant and the number of platform crossings were significantly increased in the huperzine A group and both ellagic acid dose groups compared to the model group ($P < 0.05$ or 0.01). Compared to the control group, significant morphological differences were observed in the colon tissues of the model group and the low-dose ellagic acid group; However, fewer differences were noted in the huperzine A and high-dose ellagic acid groups. Strong positive expression of ZO-1 and Claudin-1 proteins was observed in the control group, while their expression levels were significantly decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared to the model group, expression levels were significantly elevated in the huperzine A and ellagic acid groups ($P < 0.01$). Microbial richness and diversity in the model group were markedly lower than those in the control group; Treatment with high-dose ellagic acid improved microbial richness and diversity in AD mice. Compared to the control group, the abundance of Bacteroidetes was significantly reduced in AD model mice, while Firmicutes and pro-inflammatory Proteobacteria were abnormally increased. Following ellagic acid intervention, the imbalanced abundances of Firmicutes and Bacteroidetes were effectively restored, and the abundance of Proteobacteria significantly decreased. At the genus level, baseline abundance of *Lactobacillus* had already increased in the model group; After ellagic acid treatment, the abundance of pro-inflammatory *Desulfovibrio* decreased, while that of *Lactobacillus* and *Allobaculum* further increased. **Conclusion** Ellagic acid can improve AD by regulating tight junction protein expression, enhancing intestinal barrier function, reducing intestinal permeability, and improving gut microbiota structure.

Key words: ellagic acid; Alzheimer's disease; APP/PS1 double transgenic mice; microbiota-gut-brain axis; gut microbiota

阿尔茨海默病(AD)是最为常见的老年性痴呆类型。作为一种中枢神经退行性疾病,它主要表现为认知功能呈进行性受损^[1]。AD具有不可逆性和致死性,无法彻底治愈。肠道微生物群是胃肠道中的微生物,通过肠道和大脑之间的双向通讯促进大脑稳态的调节。有研究发现肠道微生物群调节与各种神经系统疾病密切相关。肠道微生物群通过肠-脑轴对大脑功能和宿主行为产生影响从而对AD发挥显著作用^[2]。现有研究证实,多酚类化合物可通过调节肠道微生物群,维持肠道屏障、中枢神经系统及肺功能的稳态。这类物质有助于肠道菌群自我修复、保持微生态平衡,还能改善宿主的认知与行为能力,对逆转因肠道菌群失调引发的AD病程加重及记忆认知缺陷具有重要意义^[3]。

鞣花酸主要存在于自然界的植物中,在石榴、黑莓、草莓、桃子、核桃、覆盆子、地锦草等中尤为丰富,其主要以单体、衍生物及复合鞣花单宁的形式存在于多种植物的液泡中。鞣花酸药理作用广泛,具有抗氧化、抗炎、抗菌、保护心血管、调节血糖等功效^[4]。本课题组前期研究证实,对APP/PS1转基因小鼠ig鞣花酸后,可有效抑制氧化应激反应引发的海马组织中A β 沉积、tau蛋白磷酸化,减轻神经炎症与氧化应激损伤,保护神经元免受损害,

进而改善小鼠的学习记忆能力^[5]。但其是否通过调节肠道菌群的组成与结构、降低血脑屏障的通透性,从而改善认知障碍,尚不明确。因此,本研究基于苏木精-伊红(HE)染色、免疫组化、16S rRNA测序探讨鞣花酸对APP/PS1双转基因小鼠微生物群-肠-脑轴的影响,阐释鞣花酸对AD的部分作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

6月龄SPF级APP/PS1双转基因小鼠24只,6只同月龄SPF级C57BL/6J野生型小鼠作为对照,体质量为(23 $\pm$ 2)g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,生产许可证号SCXK(京)2020-0044。小鼠饮水自由,进食的标准饲料由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,实验过程中动物饲养、处死、取材等过程均遵守实验动物伦理学操作规范,均在SPF级条件下进行。动物研究经黑龙江中医药大学伦理审查委员会批准,伦理学审批编号2023122929。

1.2 仪器

FS600小动物剃毛器、FS500动物手术器械(碧云天生物技术有限公司);B10500小动物称量秤(上海玉研科学仪器有限公司);一次性无菌注射器(稳健平安医疗科技有限公司);ZS-ZS606水迷宫动物

分析系统(郑州曙光科技发展有限公司); SMART 视频追踪分析系统(Panla 公司); 新物体识别暗箱(尚信生物实验设备厂); 8 号灌胃针(上海波利鸽工贸有限公司); DT96-4 型振荡器(江苏大唐医疗器械有限公司); DM1000 显微镜、EG1150H 包埋机、HI1220 恒温烤片机、RM2235 轮转式切片机(Leica 公司); BX43 显微镜(Olympus 公司); P70D20TL-D4 微波炉(格兰仕集团有限公司); HYC-310 恒温柜(海尔集团); Fume Hood 通风橱(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.3 药物与给药

二甲基亚砜(DMSO)(BioFROXX 公司, 货号 EZ2921C395); 鞣花酸(上海麦克林生化科技有限公司, 批号 C14452969, 质量分数 $\geq 90\%$); 石杉碱甲(上海源叶生物科技有限公司, 批号 H29D8J51963); 羊抗兔 IgG-HRP(批号 BA1054)、兔抗紧密连接蛋白 1(ZO-1)多克隆抗体(批号 PB9234), 武汉博士德生物工程有限公司; 兔抗 Claudin-1 多克隆抗体(杭州华安生物技术有限公司, 批号 ER1906-37)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

6 月龄 SPF 级 APP/PS1 双转基因小鼠 24 只随机分为 4 组, 每组 6 只, 分别为模型组、石杉碱甲($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组和鞣花酸低、高剂量(20 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组, 6 只同月龄 SPF 级 C57BL/6J 野生型小鼠作为对照, 分别将粉末状石杉碱甲、鞣花酸加入 DMSO 和 0.9% 氯化钠混合注射液中溶解, 配制好将其密封保存于 4°C 的冰箱中。对实验小鼠进行适应性饲养 1 周后, 开始连续 ig 给药 60 d, 对照组和模型组分别 ig 给予等体积的 DMSO、 0.9% 氯化钠混合溶液。鞣花酸给药剂量参考本课题组前期研究结果^[5], 以 20 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 ig 鞣花酸, 能有效抑制 APP/PS1 小鼠海马区 A β 沉积与 tau 蛋白过度磷酸化, 改善学习记忆能力, 且在此剂量范围内未观察到明显的不良反应。

2.2 Morris 水迷宫实验

在给药结束后, 进行 Morris 水迷宫实验, 该实验由定位航行实验和空间探索实验 2 部分组成。(1)定位航行实验: 定位航行实验历时 4 d, 用于检测动物的学习记忆获取能力。实验水池分为 4 个象限, 隐藏平台固定置于某一象限(目标象限)水面下 1 cm 处。实验期间保持周围参照物位置固定不变, 每天

训练时, 将各组小鼠从不同象限(除目标象限外)面向池壁放入水中, 记录其在 60 s 内找到目标象限的时间, 即为逃避潜伏期。若小鼠在 60 s 内未找到平台, 则逃避潜伏期为 60 s, 并由实验者引导其上平台, 停留 10 s 以强化记忆。每天训练 4 次, 取平均值作为当天逃避潜伏期数据。(2)空间探索实验: 定位航行实验结束后次日(第 5 天), 撤除水下平台, 进行空间探索实验。将各组动物从原平台象限对侧象限面向池壁放入水中, 记录其在 60 s 内在目标象限(原平台所在象限)停留时间以及穿越平台位置的次数, 评价小鼠的空间记忆保持能力。

2.3 HE 染色观察肠组织病理形态

末次实验后, 每组采用随机数字表法选取 5 只小鼠, 处死后取小鼠的结肠用 0.9% 的氯化钠溶液洗涤并储存在 10% 的福尔马林溶液中。将储存在 10% 福尔马林溶液中的结肠组织采用梯度乙醇($70\% \rightarrow 80\% \rightarrow 95\% \rightarrow 100\%$)溶液脱水, 再放入二甲苯中使其透明, 之后将结肠组织整齐地放入蜡模包埋, 待蜡块凝固后, 将结肠组织切成 $3 \sim 4 \mu\text{m}$ 的薄片并置于载玻片上。将载玻片放入二甲苯中浸泡 15 min, 重复 3 次, 采用梯度乙醇浸泡脱苯, 用蒸馏水冲洗。使用 HE 染色, 冲洗多余的染料。再次使用梯度乙醇将切片脱水, 二甲苯将其透明化, 最后使用显微镜观察结肠组织并拍照记录。

2.4 免疫组化观察 ZO-1、Claudin-1 蛋白表达

石蜡切片常规脱蜡复水后, 进行抗原修复。采用微波加热法: 将切片置于 EDTA 缓冲液($\text{pH} 9.0$)中, 高火加热至沸腾后转至低火维持 10 min, 冷却至室温。PBS 洗涤 3 次后, 滴加 3% 过氧化氢室温孵育 10 min 来阻断内源性过氧化物酶活性, PBS 再次洗涤, 随后滴加 10% 牛血清封闭液, 室温避光孵育 30 min。弃去封闭液, 滴加适当比例稀释的一抗, 置于湿盒内 4°C 孵育过夜。次日复温后, PBS 洗涤 3 次, 滴加 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h。PBS 洗涤后, DAB 显色, 显微镜下控制反应时间, 蒸馏水终止显色。苏木素复染、乙醇梯度脱水、二甲苯透明、树胶封片, 待树脂干燥后, 于显微镜下观察、采集图像分析吸光度(A)值。

2.5 16S rDNA 测序

首先收集小鼠的新鲜粪便, 放入无菌便管中。所有标本放置于 -80° 冰箱中冻存。随后将粪便样本送至派诺森公司, 采用 16S rRNA 高通量测序方法对样本中的肠道菌群进行检测, 并开展物种构

成、物种间差异与标记、Alpha 多样性、Beta 多样性及关联网络的分析。通过派诺森公司的基因云网站制备测序文库后,进行高通量上机测序。对经质量初筛的原始序列,先完成文库与样本划分、去除 barcode 序列,再对非重复序列开展 OTU 聚类分析,从而获得各组样本在不同物种分类学水平的具体组成。在此基础上,评估每个样本的 Alpha 多样性水平,对比样本间多样性与丰富度的差异;同时借助多种无监督排序和聚类方法,解析各组样本间的 Beta 多样性差异;进一步探究各组样本的物种丰度组成差异,并运用 LEfSe 分析比较样本间的微生物群落差异;此外,通过 PICRUST2 预测样本的功能丰度。

2.6 统计学分析

数据采用 SPSS 25.0 进行统计,均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,

组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA),采用 GraphPad Prism10.1.2 用于作图软件绘制图表。

3 结果

3.1 Morris 水迷宫实验结果

如表 1 所示,在为期 4 d 的定位航行训练实验中,各组小鼠的平均逃避潜伏期均呈现出较第 1 天缩短的趋势,但缩短的程度有所不同,第 1 天的各组小鼠的平均逃避潜伏期差异无统计学意义。第 2~4 天,模型组小鼠逃避潜伏期较对照组明显延长 ($P < 0.01$);石杉碱甲组和鞣花酸低、高剂量组小鼠逃避潜伏期较模型组明显缩短 ($P < 0.01$)。

空间探索实验结果见图 1、表 2,模型组实验小鼠在平台象限内的停留时间和穿越平台的次数较对照组均显著减少 ($P < 0.01$);石杉碱甲组和鞣花酸低、高剂量组的实验小鼠在平台象限内停留时

表 1 各组小鼠逃避潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Comparison of escape latency periods among different groups of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	逃避潜伏期/s			
		第1天	第2天	第3天	第4天
对照	—	44.38 ± 2.58	34.13 ± 1.85	21.03 ± 1.76	11.58 ± 1.34
模型	—	56.98 ± 2.11	55.38 ± 2.63**	50.93 ± 1.84**	47.58 ± 1.38**
石杉碱甲	0.1	42.11 ± 1.80	31.00 ± 2.06##	22.83 ± 1.95##	14.72 ± 1.47##
鞣花酸	20	49.06 ± 1.92	38.25 ± 2.02##	23.93 ± 1.84##	15.81 ± 1.38##
	50	46.09 ± 1.91	34.59 ± 1.45##	21.03 ± 1.76##	13.76 ± 1.21##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

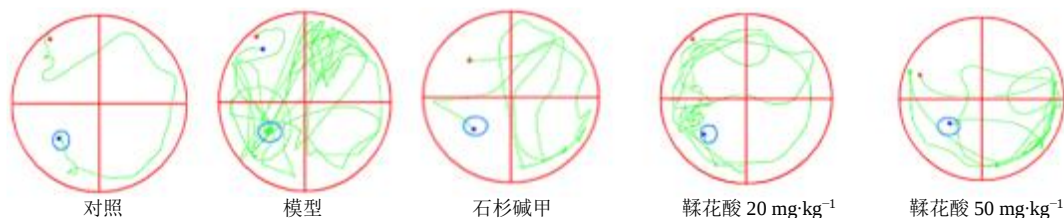


图 1 水迷宫的路线图

Fig. 1 Route map of water maze

表 2 各组小鼠穿越平台次数和目标象限停留时间比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Comparison of crossing platform times and target quadrant dwell time among different groups of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	穿越平台次数	目标象限停留时间/s
对照	—	22.12 ± 2.22	3.05 ± 1.05
模型	—	11.05 ± 1.90**	1.00 ± 0.63**
石杉碱甲	0.1	19.22 ± 2.11##	2.67 ± 0.81##
鞣花酸	20	15.08 ± 1.87#	2.50 ± 1.04##
	50	20.07 ± 1.90##	2.83 ± 0.75##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

间较模型组小鼠均显著延长 ($P < 0.01$), 穿越平台的次数显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.2 鞣花酸对 *APP/PS1* 小鼠结肠组织形态学变化的影响

结果如图 2 所示, 对照组组织结构相对完整,

腺体排列规整, 未见炎症细胞、黏膜水肿及血管扩张或出血表现; 模型组切片中出现许多空白区, 大量细胞溶解、脱落, 肠道绒毛变形, 腺体形态不规则, 组织间存在明显的疏松区域; 石杉碱甲组、高剂量鞣花酸组结肠组织结构较完整, 肠道绒毛结构

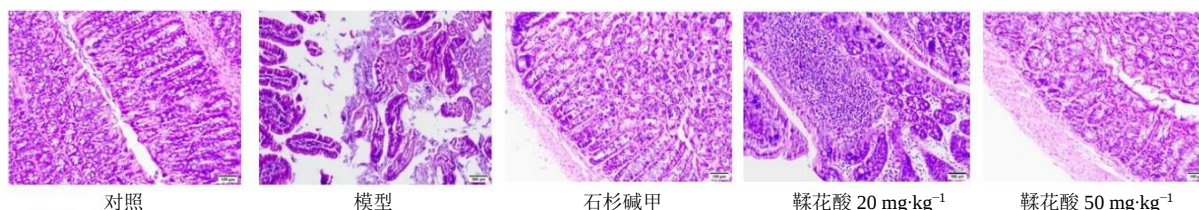


图 2 各组小鼠结肠组织 HE 染色 (×100)

Fig. 2 HE staining of colon tissue in mice from each group (×100)

较完整, 腺体排列整齐, 组织间隙稍增大, 细胞排列稍疏松, 存在黏膜层水肿的现象; 低剂量鞣花酸组结肠组织肠道绒毛结构存在部分断裂或塌陷, 腺体排列呈现轻度紊乱, 部分区域杯状细胞丢失, 在固有层和腺体周围可见大量炎症细胞浸润, 存在血管扩张现象, 局部充血。

3.3 鞣花酸对 *APP/PS1* 小鼠结肠组织中 ZO-1 和 Claudin-1 蛋白表达的影响

ZO-1 和 Claudin-1 是小鼠结肠组织紧密连接的关键蛋白, 参与维持肠上皮屏障功能和肠道通透性调节。Claudin-1 蛋白主要位于肠上皮细胞的侧膜, ZO-1 蛋白位于细胞间连接处。在正常组织中 Claudin-1 和 ZO-1 在线状紧密连接处表达, 在炎症及异常情况下表达减少或局部断裂。

定量分析结果如表 3 和图 3、4 所示, 对照组

表 3 各组小鼠结肠组织中 Claudin-1 和 ZO-1 蛋白的表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Expression levels of Claudin-1 and ZO-1 proteins in colon tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	ZO-1	Claudin-1
对照	—	0.52 ± 0.044	0.49 ± 0.025
模型	—	0.21 ± 0.036 ^{ΔΔ}	0.19 ± 0.020 ^{ΔΔ}
石杉碱甲	0.1	0.38 ± 0.043 ^{**}	0.37 ± 0.019 ^{**}
鞣花酸	20	0.23 ± 0.004 ^{*++}	0.23 ± 0.023 ^{*++}
	50	0.30 ± 0.027 ^{***#}	0.28 ± 0.015 ^{***#}

与对照组比较: ^{ΔΔ} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$;
与石杉碱甲组比较: ⁺ $P < 0.05$ ⁺⁺ $P < 0.01$; 与低剂量鞣花酸组比较: [#] $P < 0.05$ 。

^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; ⁺ $P < 0.05$ ⁺⁺ $P < 0.01$ vs huperzine A group; [#] $P < 0.05$ vs low-dose ellagic acid group.

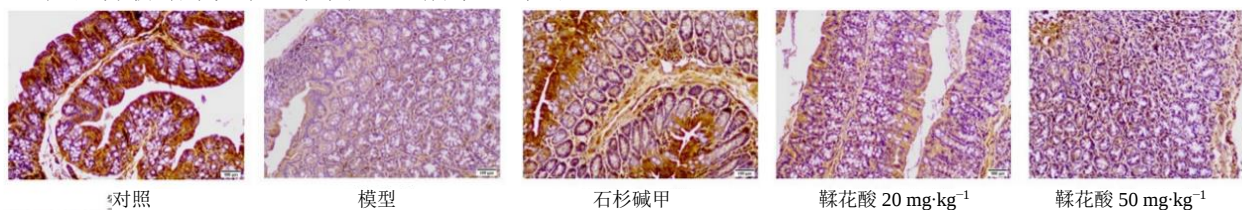


图 3 各组小鼠结肠组织 ZO-1 蛋白表达 (×100)

Fig. 3 ZO-1 protein expression in colon tissue of mice in each group (×100)

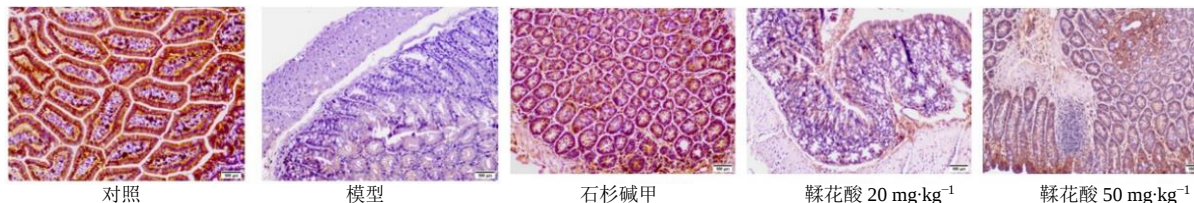


图 4 各组小鼠结肠组织 Claudin-1 蛋白表达 (×100)

Fig. 4 Expression of Claudin-1 protein in colon tissue of mice in each group (×100)

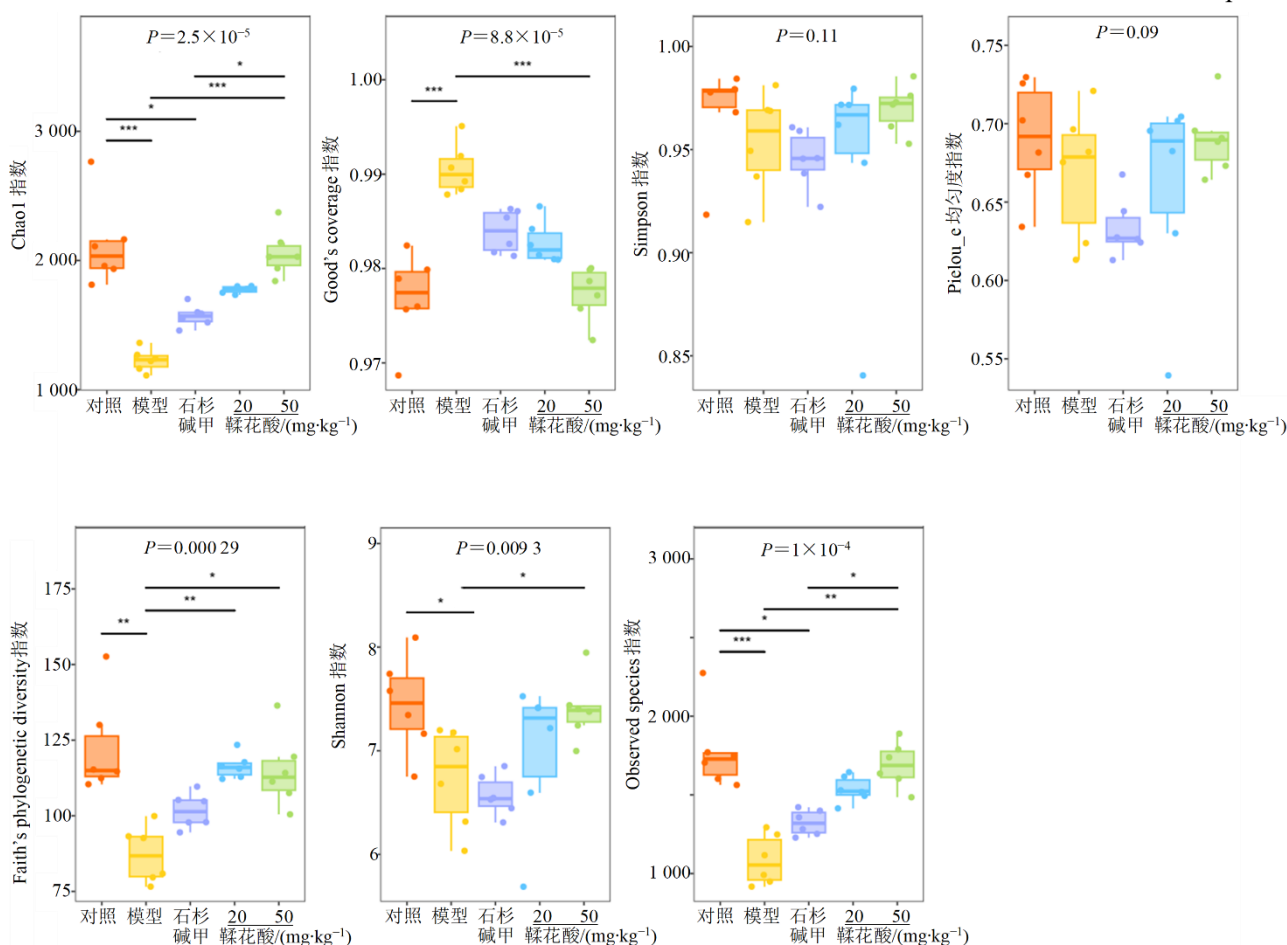
ZO-1 蛋白呈强阳性,分布均匀且密集。与对照组相比,模型组小鼠结肠组织中 ZO-1 蛋白的表达量显著下降 ($P<0.01$);与模型组相比,石杉碱甲组和鞣花酸低、高剂量组小鼠结肠组织中 ZO-1 蛋白的表达量显著上升 ($P<0.05$ 、 0.01);与石杉碱甲组相比,低、高剂量鞣花酸组小鼠结肠组织中 ZO-1 蛋白的表达量显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01);与低剂量鞣花酸组相比,高剂量鞣花酸组小鼠结肠组织中 ZO-1 蛋白的表达量上升 ($P<0.05$)。

对照组 Claudin-1 蛋白表达强阳性,在线状细胞连接处均匀分布。与对照组相比,模型组小鼠结肠组织中 Claudin-1 蛋白的表达量显著降低 ($P<0.01$);与模型组相比,石杉碱甲组和低、高剂量鞣

花酸组小鼠结肠组织中 Claudin-1 蛋白的表达量显著上升 ($P<0.05$ 、 0.01);与石杉碱甲组相比,低、高剂量鞣花酸组小鼠结肠组织中 Claudin-1 蛋白的表达量显著下降 ($P<0.01$);与低剂量鞣花酸组相比,高剂量鞣花酸组小鼠结肠组织中 Claudin-1 蛋白的表达量上升 ($P<0.05$)。

3.4 鞣花酸对 APP/PS1 小鼠肠道菌群影响 16S rRNA 检测结果

3.4.1 Alpha 多样性分析 如图 5 所示,模型组小鼠的菌群丰度和多样性明显低于对照组小鼠,具体表现为,与对照组比较,模型组 Chao1 指数 ($P<0.001$)、Faith's phylogenetic diversity 指数 ($P<0.001$)、Shannon 指数 ($P<0.05$)、Observed species



* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。

图 5 多样性指数箱线图

Fig. 5 Box plot of diversity index

指数 ($P<0.001$) 均显著降低; Good's coverage 指数显著升高 ($P<0.001$), 与菌群丰度下降特征相吻合; Simpson 指数与 Pielou_e 均匀度指数呈降低趋势, 在各组间无统计学差异。与模型组比较, 经

过鞣花酸处理的 AD 小鼠肠道菌群丰富度和多样性显著提高, 其中 Chao1 指数、Faith's phylogenetic diversity 指数、Shannon 指数 (高剂量组)、Observed species 指数均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),

高剂量 Good's coverage 指数显著回落 ($P < 0.001$)。结果表明, 经过鞣花酸, 特别是高剂量处理的 AD 小鼠其菌群丰富度和多样性的缺陷均有所改善。

3.4.2 ASV 分布 OTU 韦恩图分析 如图 6 所示,

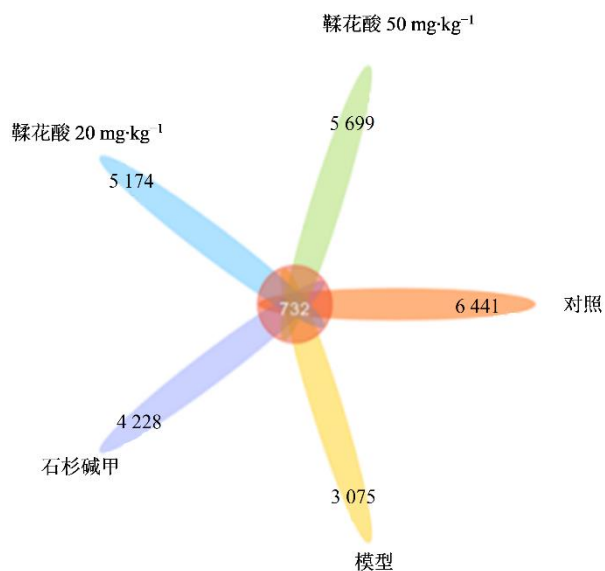


图 6 OTU 韦恩图 (ASV 水平)

Fig. 6 OTU Venn diagram (ASV)

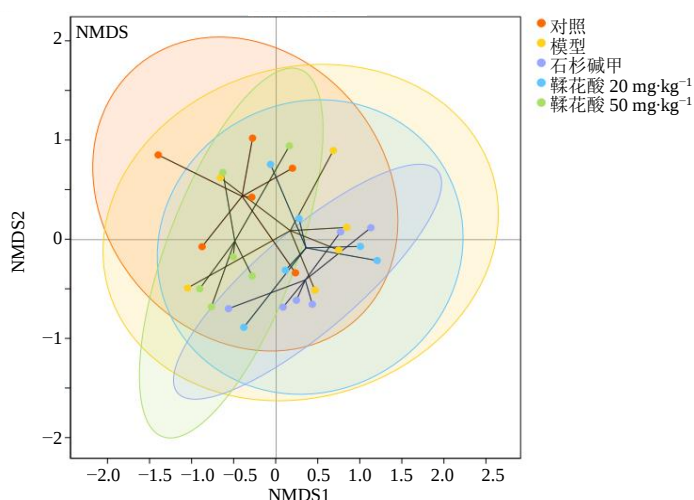
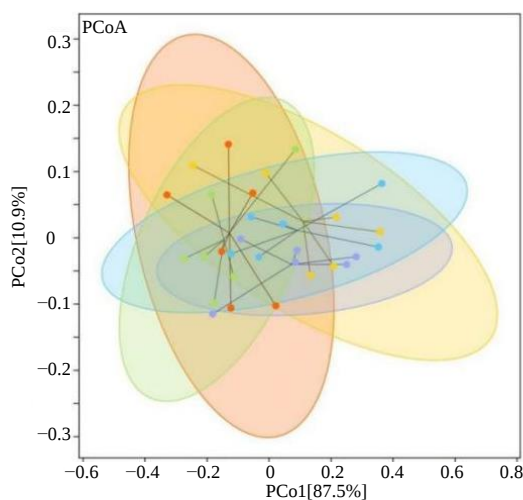


图 7 鞣花酸对 APP/PS1 小鼠肠道菌群 Beta 多样性的影响

Fig. 7 Effect of ellagic acid on Beta diversity of gut microbiota in APP/PS1 mice

节肠道菌群的组成, 促使其向正常状态恢复。

3.4.4 物种组成分析

(1) 门水平: 在门水平上排名前 10 位的分别是拟杆菌门 (Bacteroidota)、厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteriota)、变形菌门 (Proteobacteria)、髌骨细菌门 (Patescibacteria)、脱硫杆菌门 (Desulfobacterota)、弯曲杆菌

5 组样本中共有和特有的 OTU 数目, 反映两组 OTU 的差异性及相似性情况。5 组样本共有的 OTU 数目为 732 个, 对照组特有 6 441 个, 模型组特有 3 075 个; 石杉碱甲组特有 4 228 个, 鞣花酸低剂量组特有 5 174 个, 鞣花酸高剂量组特有 5 699 个, OTU 数量分布上各组存在明显差异, 模型组小鼠的 ASV 分布 OTU 数量低于对照组, 而经过鞣花酸高、低剂量处理的 AD 小鼠 ASV 分布 OTU 数量增加, 并接近于对照组水平。

3.4.3 Beta 多样性分析 如图 7 所示, 为呈现样本性差异, 采用主坐标分析 (PCoA, 加权非度量多维尺度分析, Weighted-Unifrac) 和非度量多维标度分析 (NMDS) 方法来评估微生物群落组成的动态变化, 图中的点表示样品, 不同形状的样品分属不同的组, 点与点的距离远近体现样品间的差异程度, 样本间距离越近就证明其菌群结构相似度越高, 差异也就越小。对照组的肠道微生物群落与模型组显著分离。经鞣花酸高、低剂量处理后, 肠道微生物群落明显聚集, 并逐渐接近于对照组, 而与模型组的距离显著增大。结果表明鞣花酸高、低剂量干预能够调

(Campylobacterota)、蓝细菌 (Cyanobacteria)、梭杆菌门 (Fusobacteriota)、螺旋体门 (Spirochaetota)。模型组小鼠中拟杆菌门 (Bacteroidota) 的比例较对照组下降, 而厚壁菌门 (Firmicutes) 的比例上升, 此外变形菌门 (Proteobacteria) 丰度显著上升; 与模型组相比, 鞣花酸高、低剂量能够恢复 Firmicutes、Bacteroidota 的水平。见图 8。

(2) 科水平: 由科水平肠道菌群相对丰度堆叠柱状图分析可知(图 9), 与对照组相比, 模型组小鼠的 Muribaculaceae 菌科相对丰度降低, 而乳杆菌科(Lactobacillaceae)相对丰度显著升高。经鞣花酸高、低剂量处理后, Muribaculaceae 菌科相对丰度呈现向对照组回调趋势, 同时 Lactobacillaceae 的菌群丰度下调至接近对照组水平。

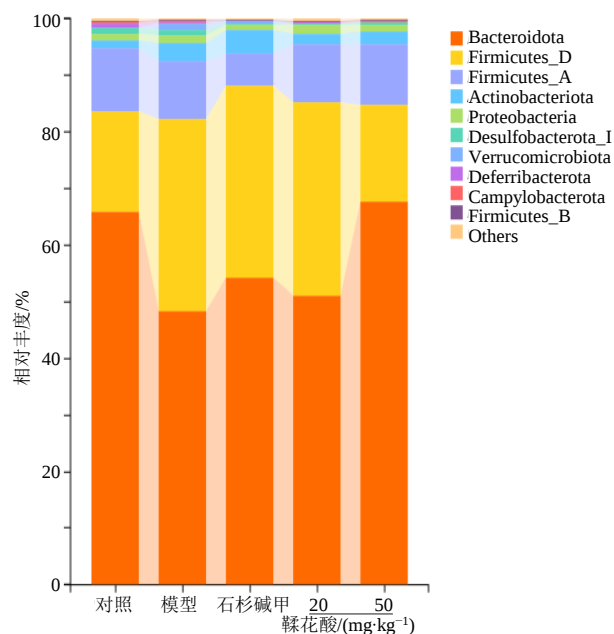


图 8 鞣花酸对 APP/PS1 小鼠肠道菌群门水平物种组成的影响

Fig. 8 Effects of ellagic acid on phylum level species composition of gut microbiota in APP/PS1 mice

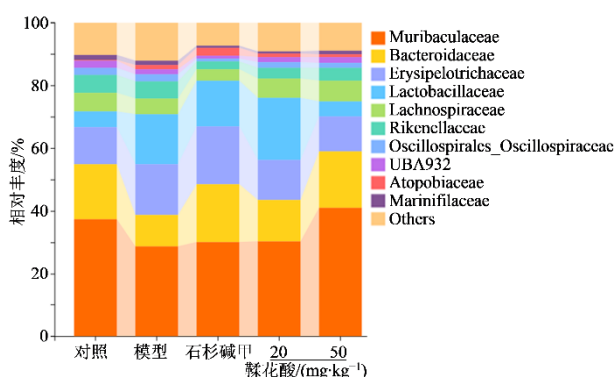


图 9 鞣花酸对 APP/PS1 小鼠肠道菌群科水平物种组成的影响

Fig. 9 Effect of ellagic acid on species composition of gut microbiota at family level in APP/PS1 mice

(3) 属水平: 如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组中乳杆菌属(Ligilactobacillus)、杜氏杆菌属

(Dubosiella) 相对丰度升高, 异普氏菌属(Alloprevotella)相对丰度降低; 与模型组比较, 经鞣花酸高、低剂量处理后 Dubosiella 相对丰度降低, Alloprevotella 的相对丰度升高, 此外鞣花酸低剂量同时提升了 Ligilactobacillus。

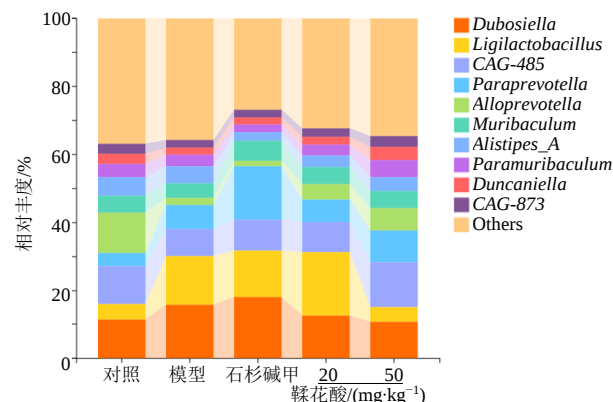


图 10 鞣花酸对 APP/PS1 小鼠肠道菌群属水平物种组成的影响

Fig. 10 Effects of ellagic acid on species composition of gut microbiota at genus level in APP/PS1 mice

3.4.5 对小鼠特异性差异菌群分析 通过 LEfSe 分析了各组小鼠肠道菌群间的生物标志物, 进一步确定鞣花酸对 APP/PS1 小鼠肠道菌群的影响。研究发现, 对照组的优势菌群在异普雷沃菌属(Alloprevotella), 属于拟杆菌门拟杆菌目。模型组的优势菌群主要为疣微菌门(Verrucomicrobiota)、疣微菌目(Verrucomicrobiales)、阿克曼菌科(Akkermansiaceae)、粪杆菌属(Faecalibacterium)、阿克曼菌属(Akkermansia)。鞣花酸高剂量组肠道菌群主要富集在拟杆菌门(Bacteroidota)、拟杆菌纲(Bacteroidia)、拟杆菌目(Bacteroidales)、异普雷沃菌属(Alloprevotella)、拟杆菌属 H(Bacteroides_H)、邓氏菌属(Duncaniella)、光杆菌属(Luxibacter)。见图 11。

4 讨论

AD 在中医学中属于“痴呆”“呆病”的范畴, 病变位于脑, 属本虚标实之证。其发病始于肾虚, 在发展过程中与痰、瘀、火相关, 病情恶化则因虚损至极、毒邪亢盛, 最终导致脑髓消减、神机失用, 从而引发痴呆^[6]。近年来, 许多研究表明肠道菌群与 AD 的发生关系密切。有研究表明, 肠道菌群失衡是 AD 诸多发病机制中的关键环节, 它可通过神经、免疫、内分泌及代谢途径与中枢神经系统形成

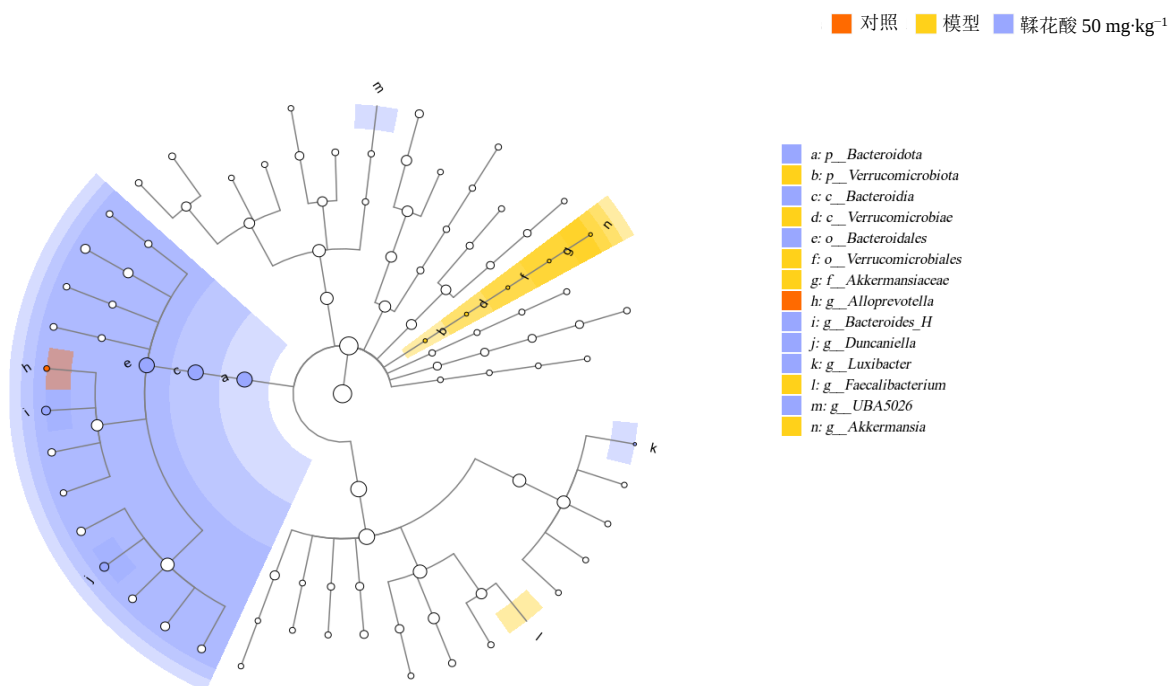


图 11 鞣花酸对 APP/PS1 小鼠肠道菌群 LefSe 分析

Fig. 11 LefSe analysis of intestinal microbiota in APP/PS1 mice treated with tannic acid

双向调控,进而产生脂多糖(LPS)、 $A\beta$ 等具有神经毒性和促炎特性的物质,增强血脑屏障的通透性,使得毒性物质借助血液循环渗透至中枢神经系统,最终引发认知功能损伤^[7-8]。

本实验结果表明,对 APP/PS1 小鼠给予高剂量鞣花酸,小鼠的空间记忆能力有着明显改善,提示鞣花酸对 APP/PS1 小鼠病理模型有正向影响。结肠组织中绒毛、腺体较为完整、规则。ZO-1 蛋白和 Claudin-1 蛋白表达量显著上升,说明鞣花酸对于 APP/PS1 小鼠模型的肠道屏障功能有显著改变,研究采用 16S rRNA 技术,系统对比各组小鼠给药前后肠道菌群的物种组成与多样性差异。菌群测序结果显示,相较于模型组,鞣花酸干预可逆转 AD 小鼠肠道微生态紊乱,回调门水平失衡的优势菌门丰度,校正科、属水平差异菌群分布,提升肠道菌群整体丰富度与多样性。门水平菌群分析结果显示,与对照组相比,AD 模型小鼠拟杆菌门丰度显著降低,厚壁菌门、促炎相关变形菌门丰度异常升高;经鞣花酸干预后,失衡的厚壁菌门、拟杆菌门丰度得到有效回调,变形菌门丰度显著下降。厚壁菌门作为肠道菌群的重要组成,是短链脂肪酸(SCFAs)的主要来源,SCFAs 可调控肠道局部免疫、抑制炎症反应,同时参与维持肠道屏障与血脑屏障完整

性,其含量异常会直接影响 AD 病理进程^[9]。模型组厚壁菌门呈现异常高表达,提示菌群代谢稳态已发生紊乱;鞣花酸干预可使该菌门丰度恢复至正常区间,保障丁酸、丙酸等 SCFAs 稳定合成,为结肠上皮细胞供给能量底物^[10],激活 G 蛋白偶联受体信号通路,进而上调 ZO-1、Claudin-1 等紧密蛋白连接的表达,降低肠道通透性,最终减轻全身炎症水平^[11]。因此,后续研究若利用靶向代谢组学,量化肠道内容物或血清中 SCFAs 的变化,并将其与菌群丰度、紧密蛋白表达数据进行中介效应分析,将能更系统地阐明鞣花酸通过“肠道菌群-代谢物-肠屏障”轴干预 AD 的机制。放线菌门在维持肠道通透性、抑制炎症反应以及直接参与神经发生机制中发挥关键作用,能在一定程度上延缓 AD 的进展。与之相反,拟杆菌门丰度过高可能导致炎症因子水平上升,进而加重 AD 的病理过程^[12-13]。在属水平上,模型组乳杆菌属本底丰度已上升;经鞣花酸干预后,促炎相关杜氏杆菌属丰度降低,同时乳杆菌属、异普氏菌属丰度进一步升高。现有研究证实乳杆菌属可合成 γ -氨基丁酸(GABA)、5-羟色胺(5-HT)、乙酰胆碱等多种调控认知的关键神经递质,当肠道菌群失衡时,乳杆菌属代谢功能受损,会加剧全身炎症与血脑屏障损伤^[14]。由此可见,鞣花酸能够减

缓 AD 的病理进程、改善学习记忆能力,其作用机制可能与调整肠道菌群的丰度和肠道菌群结构有关,进而改善海马神经元损伤。当前结果证实了鞣花酸在改善认知功能的同时,能够调节肠道菌群结构并增强肠道黏膜屏障功能,但三者之间的因果关系尚未完全明确。即鞣花酸对肠道屏障的保护作用及抗 AD 效应,是直接作用还是由肠道菌群的改变所介导,尚无法定论。后续研究可引入抗生素清除肠道菌群 (ABX) 实验,观察肠道菌群失活背景下鞣花酸对肠道屏障保护及认知改善效应是否依然存在。既往研究已表明,在 AD 转基因小鼠模型中,ABX 鸡尾酒能够显著改变肠道菌群结构并影响 A β 沉积水平^[15],且抗生素诱导的肠道菌群耗竭可进一步恶化 AD 模型小鼠的空间记忆能力^[16],若在菌群耗竭后鞣花酸的上述保护作用消失或明显减弱,则可初步确立“肠道菌群-肠屏障-AD”之间的因果关系链条,使本研究的核心假说得到更有力的支撑,其具体机制仍需进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Twarowski B, Herbet M. Inflammatory processes in Alzheimer's disease: Pathomechanism, diagnosis and treatment: A review [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6518.
- [2] Nguyen N M, Cho J, Lee C. Gut microbiota and Alzheimer's disease: How to study and apply their relationship [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 4047.
- [3] Cheng H, Zhang D D, Wu J, et al. Interactions between gut microbiota and polyphenols: A mechanistic and metabolomic review [J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 154979.
- [4] Hassonizadeh Falahieh K, Sarkaki A, Edalatmanesh M, et al. Ellagic acid attenuates post-cerebral ischemia and reperfusion behavioral deficits by decreasing brain tissue inflammation in rats [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(5): 645-653.
- [5] Zhong L L, Liu H, Zhang W J, et al. Ellagic acid ameliorates learning and memory impairment in APP/PS1 transgenic mice via inhibition of β -amyloid production and tau hyperphosphorylation [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6): 4951-4958.
- [6] 张学凯, 时晶, 倪敬年, 等. 阿尔茨海默病证候级联假说探讨 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(9): 741-744.
Zhang X K, Shi J, Ni J N, et al. Discussion on the pattern cascade hypothesis of Alzheimer's diseases [J]. *J Tradit Chin Med*, 2019, 60(9): 741-744.
- [7] Tremblay A, Lingrand L, Maillard M, et al. The effects of psychobiotics on the microbiota-gut-brain axis in early-life stress and neuropsychiatric disorders [J]. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 105: 110142.
- [8] Susmitha G, Kumar R. Role of microbial dysbiosis in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Neuropharmacology*, 2023, 229: 109478.
- [9] Tian H L, Cui J Q, Ye C, et al. Depletion of butyrate-producing microbes of the Firmicutes predicts nonresponse to FMT therapy in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2236362.
- [10] Duan J, Pan J K, Sun M C, et al. Comparative multiomics study of the effects of Ellagic acid on the gut environment in young and adult mice [J]. *Food Res Int*, 2022, 161: 111819.
- [11] Huang X Y, Oshima T, Tomita T, et al. Butyrate alleviates cytokine-induced barrier dysfunction by modifying claudin-2 levels [J]. *Biology*, 2021, 10(3): 205.
- [12] Binda C, Lopetuso L R, Rizzatti G, et al. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis [J]. *Dig Liver Dis*, 2018, 50(5): 421-428.
- [13] Zhang H, Hui X R, Wang Y L, et al. Angong Niuhuang Pill ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury in mice partly by restoring gut microbiota dysbiosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1001422.
- [14] Giovannini M G, Lana D, Traini C, et al. The microbiota-gut-brain axis and Alzheimer disease. from dysbiosis to neurodegeneration: Focus on the central nervous system glial cells [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(11): 2358.
- [15] Dodiya H B, Frith M, Sidebottom A, et al. Synergistic depletion of gut microbial consortia, but not individual antibiotics, reduces amyloidosis in APPPS1-21 Alzheimer's transgenic mice [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 8183.
- [16] Mosafari B, Jand Y, Salari A A. Antibiotic-induced gut microbiota depletion from early adolescence exacerbates spatial but not recognition memory impairment in adult male C57BL/6 mice with Alzheimer-like disease [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 176: 8-17.

[责任编辑 兰新新]