

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.07.016

论著 · 实验研究

基于高通量测序分析早产认知障碍大鼠肠道菌群结构特征

乐涛 卢红艳 薛正阳 徐苏晴 唐炜

(江苏大学附属医院儿科, 江苏 镇江 212001)

【摘要】 **目的** 分析早产认知障碍大鼠肠道菌群结构特征, 探讨肠道菌群改变与早产认知障碍的关系。**方法** 给孕 16~17 d Sprague-Dawley 大鼠连续 2 d 腹腔注射脂多糖 (LPS) 建立认知障碍模型, 以腹腔注射 PBS 为对照。孕 21 d 行剖宫术, 将早产大鼠随机分配给代母鼠喂养。于产后 30 d 利用 Morris 水迷宫中的定位航行实验对早产大鼠进行认知评估, 并分为早产认知障碍组 ($n=21$) 与正常对照组 ($n=10$)。采用苏木精-伊红染色观察两组大鼠海马病理改变, 提取各组大鼠粪便进行 16S rRNA 测序并分析。同时对两组大鼠肠道菌群进行主成分分析 (PCA)。**结果** 与对照组相比, 早产认知障碍大鼠海马可见大量神经元变性坏死; 肠道菌群丰富度及多样性降低 ($P<0.05$); 门水平上变形菌门丰度增加 ($P<0.05$); 目、科、属水平上, 普氏菌属、乳杆菌属等丰度显著降低, 葡萄球菌科、寡养杆菌属等丰度显著增加 ($P<0.05$)。PCA 显示两组大鼠在肠道菌群构成上差异明显。**结论** 早产认知障碍大鼠肠道菌群结构发生明显变化, 可为早产认知障碍导致的微生态变化的治疗及干预提供依据。**【中国当代儿科杂志, 2019, 21(7): 701-707】**

【关键词】 认知障碍; Morris 水迷宫; 肠道菌群; 早产大鼠

Structural features of intestinal flora in preterm rats with cognitive impairment: an analysis based on high-throughput sequencing

YUE Tao, LU Hong-Yan, XUE Zheng-Yang, XU Su-Qing, TANG Wei. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China (Lu H-Y, Email: lhy5154@163.com)

Abstract: Objective To study the structural features of intestinal flora in preterm rats with cognitive impairment and the association of the change in intestinal flora with cognitive impairment in preterm rats. **Methods** Sprague-Dawley rats at 16-17 days of gestation were intraperitoneally injected with lipopolysaccharide for two consecutive days to establish a model of cognitive impairment, and the rats treated with intraperitoneally injected phosphate-buffered saline were established as the control group. Cesarean section was performed on day 21 of gestation, and preterm rats were randomly assigned to healthy maternal rats for feeding. The place navigation test in the Morris water maze was used to evaluate cognition on day 30 after birth. According to the result, the preterm rats were divided into cognitive impairment group with 21 rats and normal control group with 10 rats. Hematoxylin and eosin staining was used to observe pathological changes of the hippocampus, and fecal samples were collected for 16S rRNA sequencing and analysis. A principal component analysis (PCA) was performed for intestinal flora. **Results** Compared with the normal control group, the cognitive impairment group showed degeneration and necrosis of a large number of neurons in the hippocampus. Compared with the normal control group, the cognitive impairment group had significant reductions in the abundance and diversity of intestinal flora ($P<0.05$), with a significant increase in the abundance of Proteobacteria at the phylum level ($P<0.05$), as well as significant reductions in the abundance of Prevotella and Lactobacillus and significant increases in the abundance of Staphylococcaceae and Oligella at the order, family, and genus levels ($P<0.05$). PCA showed a significant difference in the composition of intestinal flora between the two groups. **Conclusions** There is a significant change in the structure of intestinal flora in preterm rats with cognitive impairment, which provides a basis for the treatment and intervention of microecological changes due to cognitive impairment after preterm birth. **【Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(7): 701-707】**

Key words: Cognitive impairment; Morris water maze; Intestinal flora; Preterm rats

[收稿日期] 2019-01-24; [接受日期] 2019-06-10

[基金项目] 国家自然科学基金 (81741052)。

[作者简介] 乐涛, 男, 硕士研究生。

[通信作者] 卢红艳, 女, 博士, 主任医师。Email: lhy5154@163.com。

早产儿过早脱离母体,脑发育易受各种不良宫外因素及并发症影响,导致神经及认知发育异常。文献报道^[1],极早早产儿认知功能障碍发生率达40%。认知障碍等脑功能问题很大程度影响早产儿生长发育,并对今后学校教育甚至成年产生负面影响^[2]。研究发现,肠道菌群紊乱可影响认知功能,生后早期小鼠肠道益生菌群丰度和菌群多样性下降引起成年小鼠焦虑与认知行为改变^[3]。肠道菌群与大脑之间的关系可追溯到脑发育。胎儿出生后,环境中的微生物在婴儿肠道内定植并且在在大脑发育过程中起着非常重要的作用^[4]。Diaz Heijtz等^[5]研究结果显示,与无特定病原体小鼠相比,无菌小鼠大脑前额皮质多个亚区域中突触可塑性相关基因mRNA表达明显降低,下丘脑、杏仁核等区域中的突触素表达明显降低,提示肠道菌群定植在一定程度上影响了大脑发育。抑郁症及孤独症等存在认知障碍的精神神经变性疾病均存在肠道菌群异常改变^[6-7]。应用益生菌可有效改善宿主焦虑、抑郁、认知功能、自闭及应激反应等一系列神经系统功能失调^[8],提示肠道菌群在大脑发育及认知功能形成过程中起重要作用。目前有关早产认知障碍与肠道菌群关系的研究较少。本研究通过建立早产认知障碍大鼠模型,比较早产认知障碍组与正常对照组大鼠肠道菌群结构、多样性及丰度差异,从微生态角度探讨早产认知障碍与肠道菌群的关系,为早产认知障碍微生态治疗干预提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

脂多糖(LPS,美国Sigma公司),QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit试剂盒(德国QIAGEN公司),带有Barcode的16S V4通用引物(515F-806R)(美国Life公司),GoTaq[®] Hot Start Colorless Master Mix高效高保真酶(美国Promega公司)。

Morris水迷宫实验和跟踪系统由江苏大学医学院实验室提供,-80℃冰箱(德国西门子),MD荧光定量检测仪(美国Molecular Device公司),Illumina MiSeq测序仪(美国Illumina公司),Onedrop仪器(南京五义科技有限公司)。

1.2 早产认知障碍大鼠模型建立

SPF级孕16~17d健康Sprague-Dawley(SD)孕鼠,由江苏大学动物房提供,体重370~450g,实验动物质量合格证号:201819539,动物实验许可证号:SYXK(苏)2013-0036。参照文献建立认知障碍大鼠模型^[9],给孕16~17dSD大鼠连续2d腹腔内注射LPS,每次330μg/kg;以腹腔内注射PBS为对照。孕21d行剖宫产术,将早产大鼠随机分给健康代母鼠喂养;获得30只模型组早产大鼠和15只对照组早产大鼠,并进行编号。每只代母鼠喂养5只早产大鼠,室温25.0±0.5℃,12h昼/夜周期,普通大鼠饲料喂养,自由取食和饮水,喂养30d。SD大鼠1月龄时约等同于人类2~5岁,即幼儿期,此时认知功能发育正常与否基本能够充分展示^[10],故选择生后30d大鼠进行认知功能研究。Morris水迷宫实验是公认的评估啮齿类动物认知障碍的金标准^[11],本研究利用Morris水迷宫中的定位航行实验对大鼠进行认知功能评估,即找到平台时间越长得分越低,认知功能越低^[12]。两组大鼠在生后30d进行Morris水迷宫定位航行实验,从30只模型组大鼠中选择定位航行得分最低的21只大鼠作为早产认知障碍组,从15只对照组大鼠中选择定位航行得分最高的10只大鼠作为正常对照组。重新编号后进行肠道菌群检测。

1.3 大鼠粪便样本采集和贮存

两组大鼠生后30d收集大便标本:一手戴无菌手套,一手抓大鼠尾部,用75%乙醇棉球消毒大鼠肛门部位,轻柔按摩大鼠腹部刺激排便,用无菌小镊子取大鼠新排在无菌滤纸上的大便2~3粒,放入5mL灭菌离心管中。收集标本封口后立即放入-80℃冰箱保存。

1.4 海马组织标本采集与处理

Morris水迷宫实验后处死两组大鼠,采用4%多聚甲醛固定,取全脑,常规脱水,石蜡包埋,切片,行苏木精-伊红(HE)染色,观察海马细胞形态学变化。

1.5 大便16S rRNA测序流程

选用QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit试剂盒对样本基因组DNA进行提取,采用Onedrop仪器和琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度。取2.5ng稀释后的基因组DNA作为模板,使用带有Barcode

的 16S V4 通用引物 (515F-806R)、GoTaq[®] Hot Start Colorless Master Mix 高效高保真酶进行 PCR。PCR 产物使用 MD 荧光定量检测 DNA 浓度; 根据 PCR 产物浓度进行等浓度混样, 充分混匀后使用 QIAquick[®] PCR Purification Kit 试剂盒纯化回收产物。回收产物后进行第二轮扩增, 引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物, 扩增产物使用 Pico Green 荧光定量及 Agilent 2200 TapeStation 电泳工作平台检测, 合格后使用 MiSeq 进行上机测序。采用 Illumina MiSeq 测序平台得到下机数据, 对高通量测序的原始数据首先根据 Barcode 信息, 将单个样品数据拆分出来, 取出引物序列, 进行测序序列质量控制; 通过质量检查序列, 应用 Ribosomal Database Project (RDP) Classifier 2.3, 使用 Silva 数据库进行序列比对, 确定每条序列的分类等级(界、门、纲、目、科、属、种); 应用 Mothur 进行分类操作单元 (operational taxonomic units, OTUs) 划分, 以序列相似性 97% 为标准, 将这些序列划分为 OTUs, 并按照序列数量生成 OTU 丰度谱。菌群丰富度及多样性是指一个特定区域或者生态系统内菌群的丰富度及多样性, 常用的度量标准有 Chao1 指数、Ace 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数。Chao1 指数及 Ace 指数主要用于计算物种的丰富度, Chao1 指数和 Ace 指数越大, 代表样本中菌群越丰富; Shannon 指数及 Simpson 指数主要用于计算物种多样性, Shannon 指数越大, Simpson 指数越小, 代表样本中菌群多样性程度越高。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学分析, 符合正态分布计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组样本间比较采用两样本 *t* 检验。不符合正态分布计量资料以中位数 (四分位间距) [$M (P_{25}, P_{75})$] 表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。两组间肠道菌群主成分分析 (principal component analysis, PCA) 应用方差分解, 对多维数据进行降维后提取出数据中最主要的元素和结构。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫定位航行实验

在定位航行实验前, 早产认知障碍组大鼠平均体重为 109 ± 8 g, 正常对照组大鼠平均体重为 106 ± 7 g, 两组大鼠平均体重比较差异无统计学意义 ($t=1.08, P>0.05$)。在定位航行实验第 5 天, 早产认知障碍大鼠找到平台的平均时间为 40 ± 5 s, 明显长于正常对照组 (18 ± 4 s), 差异有统计学意义 ($t=13.29, P<0.05$)。

2.2 两组大鼠海马神经元病理变化

正常对照组大鼠海马神经元结构清晰, 大小正常, 细胞核呈淡蓝染色, 呈圆形、椭圆形排列。早产认知障碍组大鼠海马神经元数目明显减少, 细胞排列不整齐, 可见大量神经元变性坏死。见图 1。

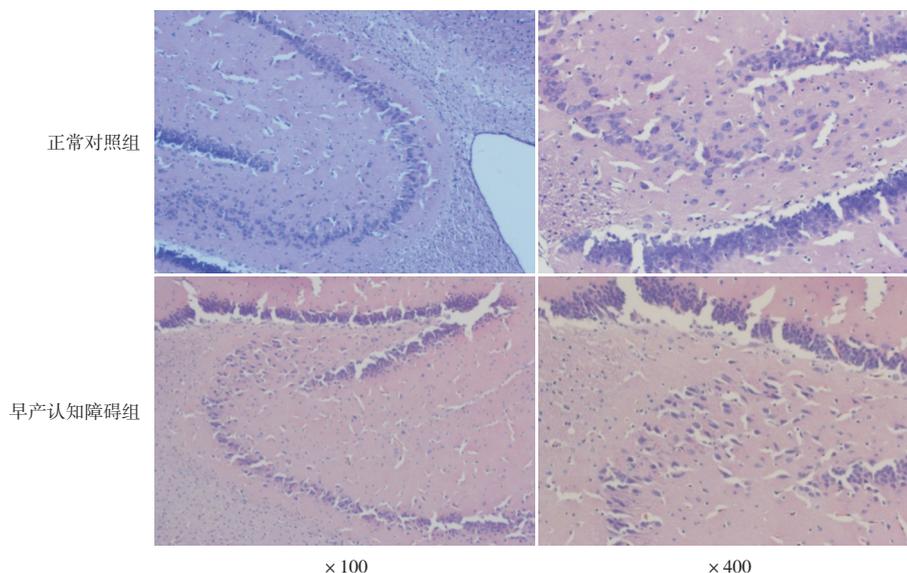


图 1 两组大鼠海马神经元病理变化 (苏木精-伊红染色) 正常对照组大鼠海马神经元结构清晰, 大小正常, 细胞核呈淡蓝染色; 早产认知障碍组大鼠海马神经元数目明显减少, 细胞排列不整齐, 可见大量神经元变性坏死。

2.3 两组大鼠肠道菌群多样性结果分析

与正常对照组相比，菌群丰富度指标 Chao1 指数及 Ace 指数在早产认知障碍组显著降低 ($P < 0.05$)；而代表菌群多样性的 Shannon 指数在早产认知障碍组也显著低于正常对照组 ($P < 0.05$)，Simpson 指数在两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组大鼠肠道菌群丰富度及多样性指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | Chao1 | Ace | Shannon | Simpson |
|---------|----|----------|----------|-----------|-------------|
| 正常对照组 | 10 | 359 ± 21 | 352 ± 15 | 3.8 ± 0.5 | 0.08 ± 0.05 |
| 早产认知障碍组 | 21 | 335 ± 25 | 332 ± 20 | 3.2 ± 0.5 | 0.06 ± 0.03 |
| t 值 | | 2.61 | 2.84 | 3.36 | 1.25 |
| P 值 | | 0.014 | 0.008 | 0.002 | 0.221 |

2.4 两组大鼠肠道菌群门水平差异性分析

所有样本菌群主要由拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、螺旋菌门 (Spirochaetae) 构成，这 4 个菌门包含了所有样本丰度 98.4% 的肠道细菌。其中，拟杆菌门和厚壁菌门为小鼠肠道菌群的优势菌群。早产认知障碍组拟杆菌门、厚壁菌门及螺旋菌门丰度与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，变形菌门丰度较正常对照组显著增加 ($P < 0.05$)。见图 2，表 2。

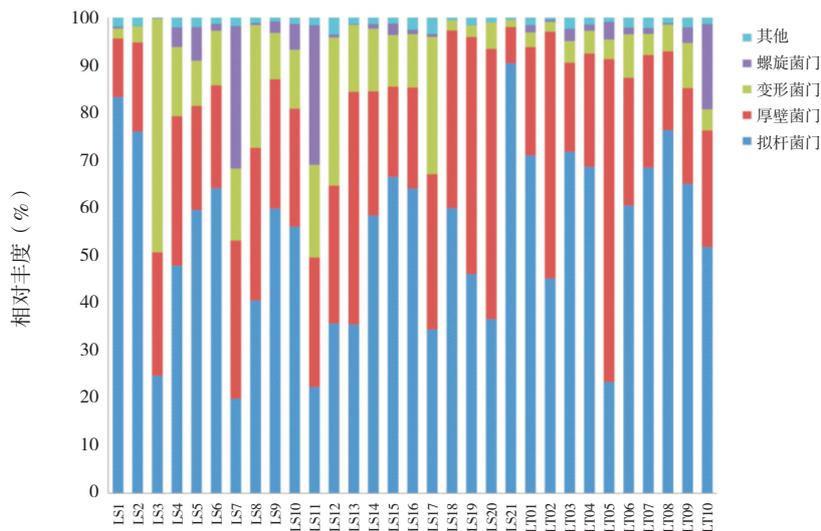


图 2 两组大鼠肠道菌群门水平分布 横坐标表示所有样本，纵坐标表示每个菌门的相对丰度。早产认知障碍组：LS1~LS21；正常对照组：LT01~LT10。

表 2 两组大鼠肠道菌群门水平优势菌群比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | n | 拟杆菌门 | 厚壁菌门 | 变形菌门 | 螺旋菌门 |
|---------|----|---------|---------|-------------|-----------|
| 正常对照组 | 10 | 60 ± 16 | 30 ± 12 | 5.2 ± 2.4 | 3.0 ± 2.0 |
| 早产认知障碍组 | 21 | 51 ± 20 | 29 ± 12 | 14.0 ± 11.7 | 3.2 ± 2.3 |
| t 值 | | 1.22 | 0.17 | 2.33 | 0.30 |
| P 值 | | 0.234 | 0.867 | 0.027 | 0.768 |

2.5 两组大鼠肠道菌群目、科、属水平差异性分析

目、科、属水平上能检测到的菌种有 97 种，取含量前 30 种进行绘图比较。与正常对照组比较，早产认知障碍组大鼠肠道中条件致病菌寡养杆菌

属、嗜冷杆菌属、葡萄球菌科、肠球菌属相对丰度显著增高 ($P < 0.05$)；而普氏菌属、乳杆菌属、拟杆菌目、普雷沃氏菌属、副杆菌属、梭菌目、另枝菌属相对丰度显著降低 ($P < 0.05$)。见表 3，图 3。

2.6 两组大鼠肠道菌群 PCA 分析

PCA 分析显示，正常对照组大鼠各样本点间距离较小，提示正常对照组大鼠肠道菌群较为相似，但早产认知障碍组大鼠各样本点间距较大，表明小鼠肠道菌群在实验条件下产生了较大的差异；且两组样本点之间距离也较大，提示两组大鼠在肠道菌群构成上差异明显。见图 4。

表3 两组大鼠肠道菌群目、科、属水平优势菌群比较 [M (P₂₅, P₇₅), %]

| 组别 | n | 普氏菌属 | 乳杆菌属 | 拟杆菌目 | 寡养杆菌属 | 普雷沃氏菌属 |
|---------|----|------------------|---------------|---------------|------------------|---------------|
| 正常对照组 | 10 | 18.9(17.6, 28.6) | 3.1(1.9, 4.3) | 4.8(3.6, 5.9) | 0.01(0, 0.03) | 2.2(1.1, 3.0) |
| 早产认知障碍组 | 21 | 6.2(3.8, 10.4) | 1.0(0.4, 3.2) | 2.0(0.7, 4.2) | 2.14(0.12, 4.92) | 0.2(0.1, 1.6) |
| U值 | | 28.00 | 51.00 | 51.00 | 13.00 | 46.00 |
| P值 | | 0.001 | 0.023 | 0.022 | <0.001 | 0.012 |

| 嗜冷杆菌属 | 副杆菌属 | 葡萄球菌科 | 肠球菌属 | 梭菌目 | 另枝菌属 |
|------------------|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0(0, 0) | 0.9(0.7, 1.0) | 0(0, 0.01) | 0.01(0.01, 0.02) | 0.62(0.54, 0.81) | 0.66(0.40, 0.77) |
| 0.42(0.03, 2.89) | 0.6(0.4, 0.8) | 0.50(0.03, 1.28) | 0.28(0.07, 1.39) | 0.21(0.15, 0.45) | 0.36(0.22, 0.60) |
| 13.50 | 55.00 | 7.00 | 24.00 | 39.00 | 56.00 |
| <0.001 | 0.035 | <0.001 | <0.001 | 0.004 | 0.039 |

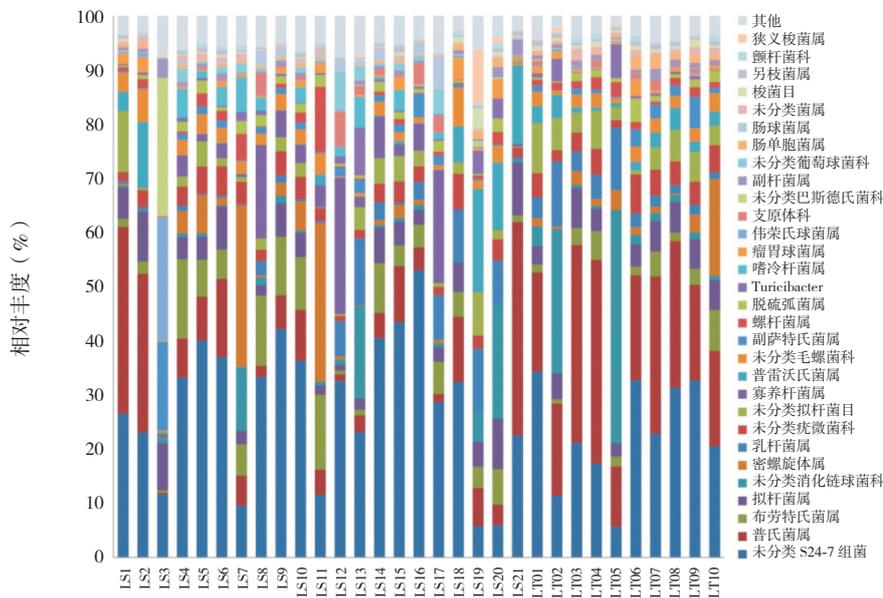


图3 两组大鼠肠道菌群目、科、属水平分布 横坐标表示所有样本，纵坐标表示每个菌群的相对丰度。早产认知障碍组：LS1~LS21；正常对照组：LT01~LT10。

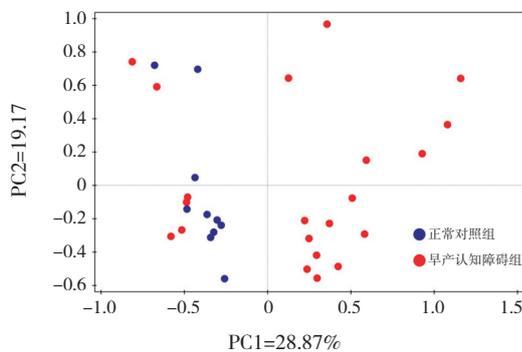


图4 主成分分析 第一主成分 (PC1) =28.87% 表示 PC1 对样品差异的贡献值；第二主成分 (PC2) =19.17% 表示 PC2 对样品差异的贡献值。

3 讨论

Morris 水迷宫实验能有效筛选出认知障碍大鼠。本研究结果发现，与正常对照组大鼠相比，在定位航行实验中，早产认知障碍大鼠找到平台的平均时间明显延长，提示存在认知障碍。海马是脑边缘系统的重要组成部分，是负责情感和认知功能的关键脑区^[13]。海马神经损伤会显著影响大鼠学习记忆能力及认知功能。本研究中大鼠海马组织 HE 染色结果发现，早产认知障碍大鼠海马组织神经元数目明显减少，细胞排列不整齐，可

见大量神经元变性坏死,进一步说明认知障碍与海马组织损伤有关。

肠道微生物被称为机体第二基因组,是人体不可分割的基因组成部分^[14]。Mayer^[15]通过MRI扫描大脑结构并比较肠道内细菌类型发现,大脑区域间连接不同,其肠道菌群也不同,推测肠道细菌在脑发育过程中可能帮助塑造大脑结构。Sudo等^[16]研究发现,无菌小鼠大脑皮层和海马组织中脑源性生长因子(BDNF)的表达量明显降低,并可能影响情绪、行为及感觉,提示肠道微生物作为重要的环境因素可影响大脑发育和功能。肠道微生物多样性的平衡对于维持宿主的健康状况至关重要^[17],普遍认为,肠道菌群多样性越高,越有利于健康。在描述疾病相关微生物群的文献中,肠道菌群多样性减低是许多疾病的共同特征,如克罗恩病、肠易激惹综合征、糖尿病、哮喘、孤独症等肠道菌群多样性均有下降,移植正常肠道菌群对这些疾病有治疗作用^[18]。Desbonnet等^[3]研究发现,小鼠口服抗生素降低肠道菌群多样性及丰富度的模型中,小鼠出现认知障碍,同时小鼠海马组织表达BDNF及5-羟色胺(5-HT)水平下降,BDNF在脑中有神经保护作用,海马组织中BDNF表达下降会降低学习和记忆功能,5-HT水平下降会导致焦虑行为,考虑肠道菌群多样性及丰富度下降可致小鼠BDNF及5-HT表达量下降是导致认知障碍的一个重要原因。本研究中对两组大鼠肠道菌群多样性分析发现,正常对照组肠道菌群种类组成的丰富度及多样性高于早产认知障碍组,这和既往在啮齿类动物中的研究结论相一致,小鼠肠道微生物群的菌群缺失可导致小鼠过度应激及焦虑行为^[3,19],推测在发育阶段,某些肠道菌群种类的缺失可能会影响宿主认知功能形成。

早产儿由于胃肠功能不成熟、出生体重低、抗生素使用等原因导致肠道菌群定植延迟,多样性丰度显著减少,达优势化时间延迟。本研究两组大鼠肠道菌群门水平差异性分析发现,早产认知障碍大鼠肠道菌群变形菌门丰度较正常对照组明显增高。研究发现^[20],变形菌门丰度越高,肠道菌群紊乱越明显,变形菌门增多已成为肠道菌群紊乱的标志物,变形菌门增多可引发肠道炎症及慢性炎症免疫应激。Yang等^[21]发现,慢性应激显著影响前额叶皮层神经元形态和功能,暴露于

慢性应激状态下的小鼠前额叶皮层细胞萎缩和髓鞘形成障碍,进一步影响认知功能。所以我们推测,变形菌门丰度增高导致肠道菌群紊乱,引起肠道炎症,导致慢性炎症应激反应,是早产认知障碍的一个重要病因。

在目、科、属水平上,Berrington等^[22]研究发现,早产儿专性厌氧菌水平降低,肠杆菌科和肠球菌科等兼性厌氧菌水平增加。Scheperjans等^[23]发现,患有神经系统疾病患者普雷沃氏菌、乳杆菌等菌属的丰度较正常人明显降低。存在认知障碍的孤独症患者普氏菌属和拟杆菌属较正常儿童丰度明显减低^[24]。本研究显示,两组肠道菌群在科、目、属水平上有着明显差异,主成分分析结果显示,认知障碍大鼠与正常对照组大鼠肠道菌群构成上有明显差异,早产认知障碍大鼠中普氏菌属、乳杆菌属、拟杆菌目、普雷沃氏菌属、副杆菌属、梭菌目、另枝菌属较正常对照组相对丰度减低;而寡养杆菌属、嗜冷杆菌属、葡萄球菌科、肠球菌属相对丰度较正常对照组增高。普氏菌属、乳杆菌属、拟杆菌目、普雷沃氏菌属、另枝菌属可以产生短链脂肪酸(SCFAs)。SCFAs是结肠细菌发酵的主要产物,可调节肠道菌群、维持体液和电解质的平衡,以及为宿主提供能量^[25]。同时,SCFAs可调节血脑屏障通透性,维持中枢神经系统内环境稳定,如果SCFAs降低则认知障碍发生的风险增高,进而影响大脑发育及行为^[26]。研究发现,乳杆菌属能够产生 γ -氨基丁酸(GABA)^[27],GABA是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经传达物质,具有保护认知功能的作用。而肠道寡养杆菌属、嗜冷杆菌属、葡萄球菌科、肠球菌属丰度增加往往会导致炎症因子长期过量释放,对大脑发育产生不利影响。

早产认知障碍大鼠肠道菌群结构发生明显变化,其丰富度及多样性降低,肠道菌群紊乱,普氏菌属、乳杆菌属、拟杆菌目、普雷沃氏菌属、另枝菌属等益生菌群丰度减低,寡养杆菌属、嗜冷杆菌属、葡萄球菌科、肠球菌属等有害菌群丰度增加,这些肠道菌群的变化可能是早产认知障碍发生的可能原因。这些发现可为早产认知障碍微生态治疗干预提供新靶点,目前肠道菌群改变如何影响早产认知障碍仍有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Odd DE, Emond A, Whitelaw A. Long-term cognitive outcomes of infants born moderately and late preterm[J]. *Dev Med Child Neurol*, 2012, 54(5): 704-709.
- [2] Rogers EE, Hints SR. Early neurodevelopmental outcomes of extremely preterm infants[J]. *Semin Perinatol*, 2016, 40(8): 497-509.
- [3] Desbonnet L, Clarke G, Traplin A, et al. Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: implications for brain and behaviour[J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 48: 165-173.
- [4] Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, et al. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems[J]. *Ann Gastroenterol*, 2015, 28(2): 203-209.
- [5] Diaz Heijt R, Wang S, Anuar F, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(7): 3047-3052.
- [6] 冯伟薇, 李欣. 肠道微生物对抑郁障碍影响的研究[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(5): 26.
- [7] de Theije CG, Wopereis H, Ramadan M, et al. Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders[J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 37: 197-206.
- [8] Schrenzel J, Lazarevic V. Intestinal microbiota: towards therapeutic applications[J]. *Rev Med Suisse*, 2017, 13(582): 1959-1961.
- [9] Muccigrosso MM, Ford J, Benner B, et al. Cognitive deficits develop 1 month after diffuse brain injury and are exaggerated by microglia-associated reactivity to peripheral immune challenge[J]. *Brain Behav Immun*, 2016, 54: 95-109.
- [10] 李晓捷, 高晶, 孙忠人. 宫内感染致早产鼠脑瘫动物模型制备及其鉴定的实验研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2004, 19(12): 885-889.
- [11] Hales JB, Ocampo AC, Broadbent NJ, et al. Consolidation of spatial memory in the rat: findings using zeta-inhibitory peptide[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2016, 136: 220-227.
- [12] 周娇娇, 阙建宇, 于雯雯, 等. Morris 水迷宫检测动物学习记忆水平的方法学[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(24): 6274-6277.
- [13] Schock L, Dyck M, Demenescu LR, et al. Mood modulates auditory laterality of hemodynamic mismatch responses during dichotic listening[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31936.
- [14] Vayssier-Taussat M, Kazimirova M, Hubalek Z, et al. Emerging horizons for tick-borne pathogens: from the 'one pathogen-one disease' vision to the pathobiome paradigm[J]. *Future Microbiol*, 2015, 10(12): 2033-2043.
- [15] Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12(8): 453-466.
- [16] Sudo N, Chida Y, Aiba Y, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice[J]. *J Physiol*, 2004, 558(Pt 1): 263-275.
- [17] Cong X, Henderson WA, Graf J, et al. Early life experience and gut microbiome: the brain-gut-microbiota signaling system[J]. *Adv Neonatal Care*, 2015, 15(5): 314-323.
- [18] Mosca A, Leclerc M, Hugot JP. Gut microbiota diversity and human diseases: should we reintroduce key predators in our ecosystem?[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 455.
- [19] Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, et al. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2014, 42: 207-217.
- [20] Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota[J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(9): 496-503.
- [21] Yang Y, Zhang Y, Luo F, et al. Chronic stress regulates NG2⁺ cell maturation and myelination in the prefrontal cortex through induction of death receptor 6[J]. *Exp Neurol*, 2016, 277: 202-214.
- [22] Berrington JE, Stewart CJ, Cummings SP, et al. The neonatal bowel microbiome in health and infection[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2014, 27(3): 236-243.
- [23] Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype[J]. *Mov Disord*, 2015, 30(3): 350-358.
- [24] Wang Y, Kasper LH. The role of microbiome in central nervous system disorders[J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 38: 1-12.
- [25] Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis[J]. *Science*, 2013, 341(6145): 569-573.
- [26] Braniste V, Al-Asmark M, Kowal C, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(263): 263ra158.
- [27] Galland L. The gut microbiome and the brain[J]. *J Med Food*, 2014, 17(12): 1261-1272.

(本文编辑: 万静)