

# 基于敲除 FMR1 基因小鼠研究肠道微生物菌群失调与孤独症之间的相关性

卢春生 陈新春 高以娟 胡雅茹  
(中国科学院大学深圳医院(光明) 518106)

**摘要:** 目的 基于敲除 FMR1 基因小鼠研究肠道微生物菌群失调与孤独症(ASD)之间的相关性。方法 构建 FMR1 基因敲除型(KO)纯合子(-/-)及其野生型(WT)纯合子(+/+) FVB 小鼠模型。统计 KO 小鼠与 WT 小鼠的肠道菌群构成情况,检测 KO 小鼠与 WT 小鼠的血清单胺类神经递质(5-HT、DA)水平,检测 KO 小鼠与 WT 小鼠大脑前扣带回部及结肠部的细胞因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )表达情况,分析肠道菌群相对丰度、单胺类神经递质水平与细胞因子水平之间的相关性。结果 KO 小鼠脱硫弧菌科、拟杆菌科、紫单胞菌科以及普氏菌属、萨特氏菌属、拟杆菌属、颤螺旋菌属、副杆状菌属的相对丰度高于 WT 小鼠,大脑前扣带回部及结肠部组织的细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平均高于 WT 小鼠,血清 5-HT、DA 水平均低于 WT 小鼠,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。普氏菌属、萨特氏菌属、拟杆菌属、颤螺旋菌属、副杆状菌属分别与血清 5-HT、血清 DA 呈负相关( $P < 0.05$ ),分别与大脑前扣带回部及结肠部的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  呈正相关( $P < 0.05$ )。结论 FMR1 基因缺失 ASD 存在明显的肠道微生物菌群失调,肠道微生物菌群失调与大脑前扣带回部及结肠部的炎症反应有关,并且与血清单胺类神经递质减少有关。

**关键词:** FMR1 基因; 肠道微生物; 孤独症; 相关性

孤独症(ASD)又称为自闭症或者孤独性障碍,主要临床表现为社交障碍、交流障碍、刻板、重复行为等,以男孩多见<sup>[1]</sup>。目前 ASD 的整体预后情况较差,关于其预后的改善仍然处于探索阶段。据相关抽样调查数据分析显示,ASD 是我国学龄前期人群精神残疾的主要原因之一<sup>[2]</sup>。脆性 X 综合征(FXS)是一种常见的遗传性精神发育迟滞,然而遗传性智力低下是引起 ASD 的最常见单基因疾病<sup>[3]</sup>。FMR1 基因是脆性 X 综合征(FXS)的明确致病基因。在关于 ASD 儿童的研究中发现,ASD 儿童存在明显的肠道菌群紊乱现象,并且与 ASD 的严重程度密切相关,这与“肠-脑轴”机制有关<sup>[4]</sup>。为进一步明确 FMR1 基因是否通过影响“肠-脑轴”机制,为 ASD 的临床诊疗获取新的思路与方向,本文基于敲除 FMR1 基因小鼠研究分析肠道微生物菌群失调与 ASD 之间的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

构建 FMR1 基因敲除型(KO)纯合子(-/-)及其野生型(WT)纯合子(+/+) FVB 小鼠模型。KO 小鼠与 WT 小鼠分别在清洁级环境中进行统一饲养,室内温度范围在 20℃至 26℃,室内相对湿度范围在 50%至 70%,各小鼠均自由饮食、饮水,光照明暗交替各 12h。本次研究选取了 20 只成熟 KO 小鼠与 20 只成熟 WT 小鼠进行研究。

### 1.2 方法

(1) 肠道菌群检测:收集小鼠粪便混悬液。使用 DNA 提取试剂进行肠道菌群 DNA 提取。进行 16S rRNA 基因测序及 DNA 序列对比。采用 UPARSE 软件计算相对丰度。

(2) 肠道菌的培养与鉴定:使用肠道非选择培养基平皿(麦康凯)、选择培养基平皿(伊红-美兰)、血平板、沙氏培养基对肠道细菌培养,然后对致病菌鉴定,明确 ASD 动物模型肠道内体内存在的致病菌种类及比例。

(3) 组织中细胞因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )表达情况。采用 Western blot 检测法获得,测定光密度值进行分析。

(4) 血清单胺类神经递质检测:单胺类神经递质包括 5-HT、DA。采用 ZT-480A 化学发光分析仪(重庆州泰生物科技有限公司)进行检测。

### 1.3 观察指标

统计 KO 小鼠与 WT 小鼠的肠道菌群构成情况,检测 KO 小鼠与 WT 小鼠的血清单胺类神经递质水平,检测 KO 小鼠与 WT 小鼠大脑前扣带回部及结肠部的细胞因子表达情况,分析肠道菌群相对丰度、单胺类神经递质水平与细胞因子水平之间的相关性。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计学分析,所有数据进行正态性检验,正态性计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 t 检验;非正态性计量资料用 M(Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub>)表示,采用非参数检验。资料用[n(%)]表示,采用  $\chi^2$  检验。数据呈正态分布,相关性分析使用 Pearson 分析,若数据呈非正态分布,相关性分析使用 Spearman 分析。当  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肠道菌群在门水平上的相对丰度对比

KO 小鼠与 WT 小鼠肠道菌群在门水平上的相对丰度对比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 肠道菌群在门水平上的相对丰度对比(单位:%)

门水平	KO 小鼠	WT 小鼠	统计值	P 值
厚壁菌门	19.51 $\pm$ 5.21	21.85 $\pm$ 4.87	1.467	0.151
变形菌门	5.41 $\pm$ 2.05	4.52 $\pm$ 1.53	1.556	0.128
脱铁杆菌门	0.82 $\pm$ 0.28	0.68 $\pm$ 0.21	1.789	0.082
拟杆菌门	74.08 $\pm$ 8.46	69.85 $\pm$ 9.21	1.513	0.139
软壁菌门	1.05 $\pm$ 0.27	1.21 $\pm$ 0.33	1.678	0.102

### 2.2 肠道菌群在科水平上的相对丰度对比

KO 小鼠的脱硫弧菌科相对丰度低于 WT 小鼠,拟杆菌科、紫单胞菌科相对丰度高于 WT 小鼠,差异存在统计学意义( $P < 0.05$ ),其余肠道菌群科差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 2 肠道菌群在科水平上的相对丰度对比(单位:%)

科水平	KO 小鼠	WT 小鼠	统计值	P 值
普氏菌科	24.01 $\pm$ 5.21	23.22 $\pm$ 4.97	0.491	0.626
帕拉普氏菌科	2.97 $\pm$ 0.27	3.15 $\pm$ 0.45	1.534	0.133
瘤胃菌科	1.96 $\pm$ 0.53	2.23 $\pm$ 0.49	1.673	0.103
螺杆菌科	3.38 $\pm$ 1.01	2.95 $\pm$ 0.82	1.478	0.148
脱硫弧菌科	0.68 $\pm$ 0.22	2.39 $\pm$ 0.56	12.710	0.000
拟杆菌科	5.85 $\pm$ 1.43	3.37 $\pm$ 1.07	6.210	0.000
紫单胞菌科	2.04 $\pm$ 0.77	0.81 $\pm$ 0.19	6.936	0.000

### 2.3 肠道菌群在属水平上的相对丰度对比

KO 小鼠的普氏菌属、萨特氏菌属、拟杆菌属、颤螺旋菌属、副杆状菌属相对丰度高于 WT 小鼠,差异存在统计学意义( $P < 0.05$ ),其余肠道菌群科差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 3。

表 3 肠道菌群在属水平上的相对丰度对比(单位:%)

科水平	KO 小鼠	WT 小鼠	统计值	P 值
普氏菌属	24.22 $\pm$ 5.28	20.48 $\pm$ 4.36	2.443	0.019

萨特氏菌属	1.56 ± 0.49	0.41 ± 0.18	9.852	0.000
普雷沃氏菌属	2.95 ± 0.79	3.12 ± 1.01	0.593	0.557
螺杆菌属	3.41 ± 1.28	2.72 ± 1.22	1.745	0.089
拟杆菌属	4.61 ± 2.27	3.58 ± 1.23	1.784	0.082
颤螺旋菌属	1.98 ± 0.29	1.37 ± 0.61	4.039	0.001
副杆状菌属	2.11 ± 0.56	1.56 ± 0.38	3.635	0.001

2.4 大脑前扣带回部及结肠部组织细胞因子表达水平对比

KO 小鼠大脑前扣带回部及结肠部组织的细胞因子 IL-1 β、IL-6、TNF-α 水平均高于 WT 小鼠, 差异具有统计学意义 (P < 0.05), 见表 4。

表 4 前扣带回部及结肠部组织细胞因子表达水平对比 (光密度值)

组织	血清细胞因子	KO 小鼠	WT 小鼠	统计值	P 值
前扣带回部	IL-1 β	0.68 ± 0.22	0.53 ± 0.21	2.206	0.034
	IL-6	0.73 ± 0.28	0.56 ± 0.19	2.247	0.031
	TNF-α	0.67 ± 0.25	0.51 ± 0.22	2.149	0.038
结肠部组织	IL-1 β	0.72 ± 0.25	0.56 ± 0.19	2.279	0.028
	IL-6	0.77 ± 0.22	0.54 ± 0.22	3.306	0.002
	TNF-α	0.75 ± 0.21	0.52 ± 0.20	3.547	0.001

2.5 血清单胺类神经递质表达水平对比

KO 小鼠的血清 5-HT、DA 水平均低于 WT 小鼠, 差异具有统计学意义 (P < 0.05), 见表 5。

表 5 血清单胺类神经递质表达水平对比

组别	5-HT (ng/mL)	DA (pg/mL)
KO 小鼠	143.36 ± 22.08	40.56 ± 13.71
WT 小鼠	195.36 ± 25.49	53.79 ± 15.25
统计值	6.896	2.885
P 值	0.001	0.006

2.6 肠道菌群相对丰度与单胺类神经递质水平及细胞因子水平之间的相关性分析

普氏菌属、萨特氏菌属、拟杆菌属、颤螺旋菌属、副杆状菌属分别与血清 5-HT、血清 DA 呈负相关 (P < 0.05), 分别与大脑前扣带回部及结肠部的 IL-1 β、IL-6、TNF-α 呈正相关 (P < 0.05), 见表 6。

表 6 肠道菌群相对丰度与单胺类神经递质水平及细胞因子水平之间的相关性分析

项目	普氏菌属		萨特氏菌属		拟杆菌属		颤螺旋菌属		副杆状菌属	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
血清 5-HT	0.728	0.011	0.822	0.004	0.741	0.010	0.827	0.004	0.806	0.006
血清 DA	0.794	0.007	0.731	0.011	0.841	0.003	0.759	0.009	0.844	0.002
前扣带回部 IL-1 β	0.788	0.007	0.762	0.008	0.812	0.005	0.838	0.003	0.779	0.007
前扣带回部 IL-6	0.743	0.010	0.835	0.003	0.776	0.007	0.729	0.011	0.823	0.004
前扣带回部 TNF-α	0.766	0.008	0.810	0.006	0.740	0.010	0.751	0.009	0.792	0.007

α										
结肠部组织	0.772	0.007	0.745	0.010	0.791	0.007	0.770	0.008	0.775	0.007
IL-1 β	0.749	0.010	0.805	0.006	0.753	0.009	0.815	0.005	0.735	0.011
结肠部组织 TNF-α	0.811	0.005	0.758	0.009	0.819	0.005	0.769	0.008	0.801	0.006

3 讨论

ASD 作为一种脑发育性障碍疾病, 对儿童的身心健康以及社会发展造成了较大的影响, 但是目前临床上关于该疾病的发病机制认识仍然不明确, 缺乏有效的药物治疗方案, 其预后往往较差。随着生态-肠-脑轴交互作用被发现以来, 该机制成为了研究 ASD 发病机制的一个重要入口<sup>[5]</sup>。FMR1 基因缺失是引发的 FXS 的主要原因, 而 FXS 又是引起 ASD 的最常见单基因疾病。故本文以敲除 FMR1 基因小鼠实验研究肠道微生物菌群失调与 ASD 的关系。

本次研究显示, KO 小鼠与 WT 小鼠肠道菌群的脱硫弧菌科、拟杆菌科、紫单胞菌科的相对丰度差异存在统计学意义, 普氏菌属、萨特氏菌属、拟杆菌属、颤螺旋菌属、副杆状菌属的相对丰度差异存在统计学意义。由此提示, ASD 存在明显的肠胃微生物菌群失调现象。KO 小鼠大脑前扣带回部及结肠部组织的细胞因子 IL-1 β、IL-6、TNF-α 水平均高于 WT 小鼠, 血清 5-HT、DA 水平均低于 WT 小鼠。由于 ASD 肠胃微生物菌群失调使得肠道壁受损, 细菌进入肠系膜淋巴组织, 引发免疫炎症反应, 激活迷走神经与脊髓传入神经元, 影响中枢神经系统活动, 使其功能受损, 表现出神经递质紊乱<sup>[6-7]</sup>。本文发现, 普氏菌属、萨特氏菌属、拟杆菌属、颤螺旋菌属、副杆状菌属分别与血清 5-HT、血清 DA 呈负相关, 分别与大脑前扣带回部及结肠部的 IL-1 β、IL-6、TNF-α 呈正相关。说明肠道微生物菌群失调与 ASD 的发生具有密切关系。

综上所述, FMR1 基因缺失 ASD 存在明显的肠道微生物菌群失调, 肠道微生物菌群失调与大脑前扣带回部及结肠部的炎症反应有关, 并且与血清单胺类神经递质减少有关。

参考文献:

- [1] 胡进明, 刘兴华, 詹国栋, 等. 孤独症谱系障碍儿童感觉异常现状调查及相关临床特征的关联分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2021, 29(4): 362-366.
  - [2] 吉宁, 黄悦勤, 李恒, 等. 我国儿童和青少年孤独症归因残疾率及其分布的现况调查[J]. 中国心理卫生杂志, 2014, 28(11): 813-816.
  - [3] 中国医师协会医学遗传医师分会临床遗传学组, 中华医学会医学遗传学分会临床遗传学组, 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会遗传病防控学组, 等. 脆性 X 综合征的临床实践指南[J]. 中华医学遗传学杂志, 2022, 39(11): 1181-1186.
  - [4] 曾津, 危松青, 王曼知. 孤独症谱系障碍患儿肠道菌群与症状严重程度相关性分析[J]. 精神医学杂志, 2020, 33(1): 62-65.
  - [5] 欧阳颖仪, 陈盛强, 田丽如, 等. Fmr1 基因敲除型小鼠肠道菌群结构分析[J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2020, 8(3): 158-165.
  - [6] 刘雪红, 姜鸣, 杨清湖, 等. 自闭基因 Fmr1 和 MeCP2 与 GABA 神经微环路调控[J]. 延安大学学报(医学科学版), 2021, 19(2): 81-86.
  - [7] 梁晶晶, 马冰洁, 静进. 微生物-肠-脑轴在孤独症谱系障碍中作用的研究进展[J]. 教育生物学杂志, 2020, 8(1): 74-78.
- 基金资助: 广东省深圳市光明区软科学基金项目(2021R01133)