

## · 基础研究 ·

# 脆弱拟杆菌BF839可改善 $Fmr1$ KO小鼠的学习记忆能力及社交新奇偏好能力

林楚慧<sup>1</sup> 曾婷<sup>1</sup> 林键泓<sup>2</sup> 肖枫<sup>2</sup> 段现来<sup>3</sup> 陈盛强<sup>2</sup> 邓宇虹<sup>1</sup>

<sup>1</sup>广州医科大学附属第二医院临床营养科,广州 510260; <sup>2</sup>广州医科大学卫生管理学院,广州 511483; <sup>3</sup>长沙市第三医院神经内科,长沙 410015

通信作者:邓宇虹,Email:1376708863@qq.com

**【摘要】目的** 观察脆弱拟杆菌BF839干预对脆性X智力低下基因1( $Fmr1$ )敲除( $Fmr1$  KO)小鼠学习记忆能力及社交新奇偏好能力的影响。**方法** 将3周龄30只FVB系 $Fmr1$  KO小鼠按随机数字表法分为 $Fmr1$  KO组( $n=15$ )和 $Fmr1$  KO+BF839组( $n=15$ ), $Fmr1$  KO组小鼠每天自由饮用高压灭菌自来水, $Fmr1$  KO+BF839组小鼠每天饮用BF839菌液(10 mL/d)。另取11只每天自由饮用高压灭菌自来水的野生型(WT)小鼠作为对照(WT组)。干预4周后,采用Morris水迷宫实验观察各组小鼠间逃避潜伏期、穿越原平台次数的差异,采用三箱社交实验观察各组小鼠间与陌生小鼠接触次数、接触时间的差异。**结果**  $Fmr1$  KO组小鼠第4天的逃避潜伏期[(46.06±10.29) s]明显高于WT组[(33.39±12.02) s], $Fmr1$  KO+BF839组小鼠第4天的逃避潜伏期[(28.39±9.07) s]明显低于 $Fmr1$  KO组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ); $Fmr1$  KO+BF839组小鼠第4天的逃避潜伏期略低于WT组,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。 $Fmr1$  KO组小鼠穿越原平台次数[0.00(0.00, 1.00)次]略低于WT组[1.00(0.00, 1.00)次],差异无统计学意义( $P>0.05$ ); $Fmr1$  KO+BF839组小鼠穿越原平台次数[1.50(1.00, 2.00)次]明显高于 $Fmr1$  KO组及WT组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。 $Fmr1$  KO组小鼠与陌生小鼠的接触次数[5.50(0.50, 12.75)次]少于WT组[7.00(4.00, 17.00)次],但差异无统计学意义( $P>0.05$ ); $Fmr1$  KO+BF839组小鼠与陌生小鼠的接触次数[23.00(16.00, 36.00)次]明显多于 $Fmr1$  KO组及WT组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。 $Fmr1$  KO组小鼠与陌生小鼠的接触时间[9.50(0.50, 41.95) s]明显少于WT组[142.00(65.00, 171.60) s],差异有统计学意义( $P<0.05$ ); $Fmr1$  KO+BF839组小鼠与陌生小鼠的接触时间[69.60(50.40, 98.40) s]明显多于 $Fmr1$  KO组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ); $Fmr1$  KO+BF839组小鼠与陌生小鼠的接触时间少于WT组,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** BF839早期干预能明显提高 $Fmr1$  KO小鼠的学习记忆能力及社交新奇偏好能力,甚至使 $Fmr1$  KO小鼠恢复至正常水平,提示BF839有可能成为治疗脆性X综合征及孤独症的新工具。

**【关键词】** 脆弱拟杆菌839; 脆性X综合征; 孤独症; 学习记忆能力; 社交新奇偏好能力

**基金项目:**广州市卫生健康科技项目一般引导项目(20201A011081);湖南省卫生健康委科研计划课题项目(A20182006)

DOI:10.3760/cma.j.cn115354-20211220-00835

## Bacteroides fragilis BF839 can improve learning, memory and social novelty of fragile X-mental retardation gene 1 knockout mice

Lin Chuhui<sup>1</sup>, Zeng Ting<sup>1</sup>, Lin Jianhong<sup>2</sup>, Xiao Feng<sup>2</sup>, Duan Xianlai<sup>3</sup>, Chen Shengqiang<sup>2</sup>, Deng Yuhong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Nutrition, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China; <sup>2</sup>Medical Administration College, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China; <sup>3</sup>Department of Neurology, Third Hospital of Changsha, Changsha 410015, China

Corresponding author: Deng Yuhong, Email: 1376708863@qq.com

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of bacteroides fragilis BF839 intervention on learning, memory and social novelty of fragile X-mental retardation gene 1 ( $Fmr1$ ) knockout (KO) mice. **Methods** Thirty three-week-old  $Fmr1$  KO mice were randomly divided into  $Fmr1$  KO group

( $n=15$ ) and *Fmr1* KO+BF839 group ( $n=15$ ). Mice in the *Fmr1* KO group freely drank autoclaved tap water everyday; mice in the *Fmr1* KO+BF839 group drank BF839 bacterial liquid (10 mL/d) everyday. Eleven wild-type (WT) mice freely drank autoclaved tap water everyday were set as controls (WT group). After 4 weeks of intervention, Morris water maze test was used to observe the differences in escape latency and number of times of crossing the original platform among mice in each group; Three-chamber Social Interaction Test was used to observe the difference in number of contacts and contact time of unfamiliar mice among mice in each group. **Results** The escape latency of mice in the *Fmr1* KO group ([46.06±10.29] s) was significantly longer than that in the WT group ([33.39±12.02] s) on the 4<sup>th</sup> d of experiment ( $P<0.05$ ); the escape latency of mice in the *Fmr1* KO+BF839 group ([28.39±9.07] s) was significantly shorter than that in the *Fmr1* KO group on the 4<sup>th</sup> d of experiment ( $P<0.05$ ); the escape latency of mice in the *Fmr1* KO+BF839 group was slightly shorter than that in the WT group without significant difference ( $P>0.05$ ). The number of times of crossing through the original platform of mice in *Fmr1* KO group (0.00[0.00, 1.00]) was slightly less than that in WT group (1.00 [0.00, 1.00]) without significant difference ( $P>0.05$ ); that in the *Fmr1* KO+BF839 group (1.50[1.00, 2.00]) was significantly larger than that in the *Fmr1* KO group and WT group ( $P<0.05$ ). The number of contacts of the mice in the *Fmr1* KO group with the unfamiliar mice (5.50[0.50, 12.75]) was less than that in the WT group (7.00[4.00, 17.00]) without significant difference ( $P>0.05$ ); that in the *Fmr1* KO+BF839 group (23.00[16.00, 36.00]) was significantly increased as compared with that in the *Fmr1* KO group and WT group ( $P<0.05$ ). The contact time of the mice in the *Fmr1* KO group with unfamiliar mice (9.50[0.50, 41.95] s) was significantly shorter than that in the WT group (142.00[65.00, 171.60] s,  $P<0.05$ ); *Fmr1* KO+BF839 group had significantly longer contact time with unfamiliar mice (69.60 [50.40, 98.40] s) than *Fmr1* KO group ( $P<0.05$ ); the contact time of mice in *Fmr1* KO+BF839 group with unfamiliar mice was shorter than that in WT group without significant difference ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Early BF839 intervention can significantly improve the learning, memory abilities and social novelty of *Fmr1* KO mice, and even restore the *Fmr1* KO mice to normal levels, which suggests that BF839 may become a new tool for the treatment of fragile X syndrome and autism.

**[Key words]** *Bacteroides fragilis* 839; Fragile X syndrome; Autism; Learning and memory; Social novelty

**Fund program:** General Guidance Project of Guangzhou Health Science and Technology Project (20201A011081); Scientific Research Project of Hunan Provincial Health Commission (A20182006)

DOI:10.3760/cma.j.cn115354-20211220-00835

脆性X综合征(fragile X syndrome, FXS)是临床常见的一种可导致智力低下或孤独症样行为的神经发育障碍性疾病,因X染色体上脆性X智力低下基因1(脆性X-mental retardation gene 1, *Fmr1*)5'端非翻译区CGG重复序列的突变、异常扩增和启动子区域的甲基化导致*Fmr1*基因沉默而缺乏FMR1蛋白致病<sup>[1-3]</sup>。*Fmr1*基因敲除(*Fmr1* KO)小鼠是通过诱导小鼠*Fmr1*基因突变而造成小鼠无法表达FMR1蛋白的一种FXS模型,目前该模型已被广泛用于FXS或孤独症的研究中<sup>[4]</sup>。

近年来,大量研究发现缺乏正常的肠道菌群会影响动物神经系统的发育、行为和基因表达<sup>[5-6]</sup>。本课题组既往也发现*Fmr1* KO与野生型(WT)小鼠在肠道微生物群落的结构及多样性方面存在明显差异<sup>[7]</sup>。这就使得通过干预肠道菌群来治疗那些尚无确切有效疗法的疾病成为了可能。2013年Hsiao

等<sup>[8]</sup>报道使用非产毒菌株脆弱拟杆菌NCTC9343可改善丙戊酸钠母体免疫激活(MIA)后代小鼠(一种孤独症小鼠模型)的刻板、焦虑行为,提示脆弱拟杆菌可作为治疗孤独症的一种新工具。脆弱拟杆菌的另一株非产毒菌株BF839是我国微生物学家张季阶于1983年9月从健康婴幼儿粪便中分离、培养并产业化的肠道共生菌,由其发酵制得的图腾益生液已在中国上市超过20年<sup>[9-10]</sup>。本课题组前期研究发现应用BF839辅助治疗难治性癫痫患者,可使21.2%(10/47)患者的认知功能有所改善<sup>[11]</sup>。因此,本课题组推测给予BF839干预或许也可以改善*Fmr1* KO小鼠的智力低下及孤独症样行为,为此观察了该菌对*Fmr1* KO小鼠学习记忆能力及社交新奇偏好能力的影响,以期为进一步开展BF839治疗FXS和孤独症的临床试验提供实验参考。

## 材料与方法

### 一、实验动物及分组设计

SPF级*Fmr1* KO纯合子(−/−)及WT纯合子(+/+)FVB近交系小鼠由荷兰伊拉斯塔斯大学细胞生物学及遗传学研究中心Oostra BA教授惠赠,在广州医科大学实验动物中心繁育饲养。本研究经广州医科大学附属第二医院实验动物伦理委员审批[批号:SYXK(粤)2018-0192]。

选用3周龄小鼠为实验对象,其中30只*Fmr1* KO小鼠按随机数字表法分为*Fmr1* KO组和*Fmr1* KO+BF839组,每组15只,每天分别以自由饮水模式饮用高压灭菌自来水或BF839菌液,持续4周;11只WT小鼠作为正常对照(WT组),每天以自由饮水模式饮用高压灭菌自来水,持续4周。于小鼠7~8周龄时进行动物行为学实验,实验时间持续1周,在上午9:00到下午16:00之间进行。

### 二、PCR鉴定实验小鼠基因型

因本实验小鼠为稳定繁殖,故在实验前仅随机抽取3只*Fmr1* KO小鼠和4只WT小鼠进行PCR检测以鉴定其基因型,具体过程参考文献[12]报道。引物M2(5'-AGTCATGCTATGGATATCAG-3')和N2(5'-TGGGCTCTATGGCTTCTGA-3')用于检测*Fmr1* KO小鼠*Fmr1*中包含新霉素插入片段的等位基因片段(扩增大小约800 bp),引物S1(5'-GTGGTTAGCTAAAGTGAGGATGAT-3')和S2(5'-CAGGTTGTTGGGATTAACAGATC-3')用于检测WT小鼠的*Fmr1*等位基因片段(扩增大小约468 bp)。

### 三、BF839来源及剂量选择

本研究中BF839菌液(图腾益生液)购自沈阳新图腾生物工程有限公司,每支菌液含量为25 mL,含BF839活菌量 $25\times10^8$  CFU。图腾益生液的人体推荐量为每人(成人)200 mL/(d·60 kg),相当于3.3 mL原液/(d·kg)。小鼠的等效剂量相当于人体推荐量的10倍,即每日食用原液33 mL/kg。本课题组根据前期预实验结果及临床治疗经验,预设给予4周的15倍高剂量原液(500 mL/kg),按每只小鼠平均体质量20 g计算约等于10 mL/(d·只)。因此,本研究给予每笼*Fmr1* KO+BF839组小鼠(共5只)每天2支BF839菌液,每只小鼠平均每天摄入约10 mL菌液(活菌量约 $10\times10^8$  CFU)。

### 四、Morris水迷宫实验

参考文献[13]报道,采用Morris水迷宫实验观

察实验小鼠的学习记忆能力。水迷宫的水池为圆形,直径120 cm,高50 cm;逃避平台亦为圆形,直径5 cm,高30 cm;水深刚好没过平台1 cm,温度21~22 °C。(1)定位航行实验:小鼠连续实验4 d,每天4次,每次间隔30 s。使用摄像头跟踪小鼠的运动轨迹并用SMART软件记录小鼠按顺序分别从不同的象限中不同入水点入水到爬上平台的时间(逃避潜伏期),将4次逃避潜伏期成绩的均值作为当天最终成绩。实验过程中,如果小鼠在60 s内未找到平台,将其引至平台,放置10 s,其逃避潜伏期按60 s计算。(2)空间探索实验:第5天撤去平台,在原平台象限的对侧将小鼠放入水中,使用摄像头跟踪小鼠的运动轨迹并用SMART软件记录小鼠在60 s内穿越原平台的次数。

### 五、三箱社交实验

参考文献[8, 14]报道,采用三箱社交实验观察实验小鼠的社交行为。三箱含有3个透明塑料舱室,用2块隔板分成左中右3个舱室,各舱室大小均为20 cm×40 cm×23 cm。在每块隔板底部设置1个矩形开口(6 cm×6 cm),可让实验小鼠自由进入各舱室。实验开始前,在左右舱室里各放1个空金属笼子,将测试小鼠沿中间舱室侧壁放入三箱内,让其适应10 min。实验第一阶段:将测试小鼠取出,在左侧舱室的空金属笼子里放入1个金属小球,在右侧舱室的空金属笼子里放入1只同笼同性别小鼠,最后将测试小鼠再次沿中间舱室侧壁放入三箱内,让测试小鼠在3个舱室内自由活动10 min,从而评估其总体的社交/非社交行为情况。实验第二阶段:将测试小鼠取出,在有金属小球的金属笼子中用1只不同笼、同性别小鼠取代金属小球,将测试小鼠再次沿中间舱室侧壁放入三箱内,让测试小鼠在3个舱室内自由活动10 min,从而评估其社交新奇偏好。使用摄像头跟踪测试小鼠的运动轨迹并用SMART软件记录小鼠与金属笼子接触的次数和时间(金属笼子周围4.0 cm定义为接触范围),记录10 min。每只实验小鼠每阶段实验只做1次。

### 六、统计学分析

使用SPSS22.0统计软件进行数据分析。呈正态分布的计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-t法;呈非正态分布的计量资料以中位数(第一四分位数,第三四分位数)[ $M(Q_1, Q_3)$ ]表示,组间比较采用Kruskal-Wallis H检验,进一步两两比较采用Nemenyi检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

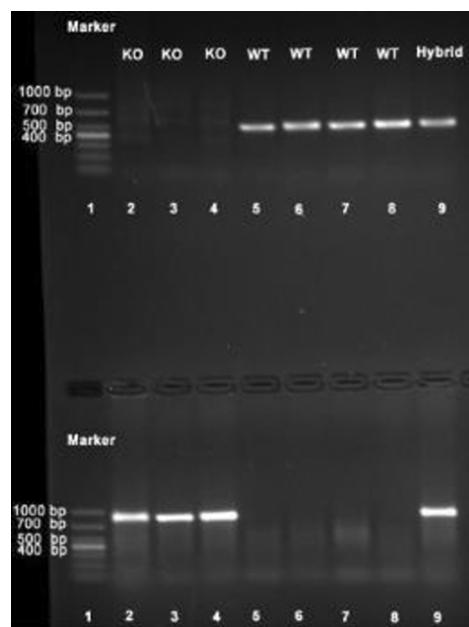
### 一、实验小鼠基因型

PCR 检测显示,在 *Fmr1* KO 小鼠中扩增出约 800 bp 的 DNA 片断,在 WT 小鼠中扩增出约 468 bp 的 DNA 片断,即 *Fmr1* KO 小鼠由于在 *Fmr1* 基因第 5 个外显子中插入了 1 个新霉素片断而阻断了 468 bp DNA 片断的扩增,证实 *Fmr1* KO 小鼠存在 *Fmr1* 基因缺陷。具体内容见图 1。

### 二、Morris 水迷宫实验结果

定位航行实验中,3 组小鼠间前 3 天的逃避潜伏期总体差异均无统计学意义( $F=0.976, P=0.614; F=0.922, P=0.631; F=1.404, P=0.496$ );第 4 天的逃避潜伏期总体差异有统计学意义( $F=6.932, P=0.040$ ),其中,*Fmr1* KO 组小鼠第 4 天的逃避潜伏期[( $46.06\pm10.29$ ) s]明显高于 WT 组[( $33.39\pm12.02$ ) s],*Fmr1* KO+BF839 组小鼠第 4 天的逃避潜伏期[( $28.39\pm9.07$ ) s]明显低于 *Fmr1* KO 组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );*Fmr1* KO+BF839 组小鼠第 4 天的逃避潜伏期略低于 WT 组,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。具体内容见图 2。

空间探索实验中,3 组小鼠间穿越原平台次数总体差异有统计学意义( $H=11.172, P=0.004$ ),其中,*Fmr1* KO 组小鼠穿越原平台次数[ $0.00(0.00, 1.00)$



泳道 1 为 DNA 分子量标准物,泳道 2~4 为 *Fmr1* KO 小鼠的 PCR 产物,泳道 5~8 为 WT 小鼠的 PCR 产物,泳道 9 为杂合子小鼠的 PCR 产物(阳性对照);*Fmr1*:脆性 X 智力低下基因 1;KO:基因敲除;WT:野生型

图 1 *Fmr1* KO 小鼠和 WT 小鼠 *Fmr1* 基因片断 PCR 扩增结果

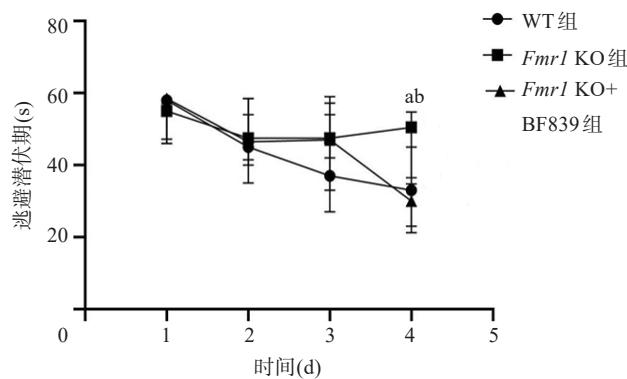
**Fig.1** Results of amplification of gene fragments in fragile X-mental retardation gene 1 knockout mice and wild-type mice

次]略低于 WT 组[ $1.00(0.00, 1.00)$  次],差异无统计学意义( $P>0.05$ );*Fmr1* KO+BF839 组小鼠穿越原平台次数[ $1.50(1.00, 2.00)$  次]明显高于 *Fmr1* KO 组及 WT 组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 三、三箱社交实验结果

实验第一阶段中,3 组小鼠间与熟悉小鼠、金属小球接触次数的差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),但与熟悉小鼠、金属小球接触时间的差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),其中,与 WT 组比较,*Fmr1* KO 组小鼠与熟悉小鼠、金属小球接触时间明显减少,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与 *Fmr1* KO 组比较,*Fmr1* KO+BF839 组小鼠与熟悉小鼠、金属小球接触时间增多,但差异均无统计学意义( $P>0.05$ );与 WT 组比较,*Fmr1* KO+BF839 组小鼠与熟悉小鼠、金属小球接触时间减少,但差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。具体内容见表 1。

实验第二阶段中,3 组小鼠间与熟悉小鼠接触次数的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但与陌生小鼠接触次数的差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其中,与 WT 组比较,*Fmr1* KO 组小鼠与陌生小鼠接触次数减少,但差异无统计学意义( $P>0.05$ );与 *Fmr1* KO 组比较,*Fmr1* KO+BF839 组小鼠与陌生小鼠接触次数明显增多,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与 WT 组比较,*Fmr1* KO+BF839 组小鼠与陌生小鼠接触次数明显增多,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。另外,3 组小鼠间与熟悉小鼠、陌生小鼠接触时间的差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),其中,与 WT 组比较,*Fmr1* KO 组小鼠与熟悉小鼠、陌生小鼠接触时间均明显减少,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与 *Fmr1* KO 组比较,*Fmr1* KO+BF839 组小鼠与熟悉小鼠接触时间增加,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),与陌生小鼠接触时



与 WT 组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 *Fmr1* KO+BF839 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

*Fmr1*:脆性 X 智力低下基因 1;KO:基因敲除;WT:野生型

图 2 3 组小鼠间各时间点的逃避潜伏期比较

**Fig.2** Comparison of escape latency among the 3 groups at different time points

间明显增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与WT组比较,*Fmr1* KO+BF839组小鼠与熟悉小鼠接触时间明显减少,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),与陌生小鼠接触时间减少,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。具体内容见表2。

## 讨 论

Morris水迷宫是水迷宫实验中常用的一种设备,它通过强迫实验动物(大鼠、小鼠)游泳,让实验动物学习在水中寻找隐藏平台,并通过分析其找到平台所用时间和所走路径,测试实验动物对空间位置觉和方向觉(空间定位)的学习记忆能力,进而判断实验动物的记忆功能好坏<sup>[15]</sup>。其中采用最多的指标是定位航行实验中的“逃避潜伏期”和空间探索实验中的“跨越原平台次数”。“逃避潜伏期”越短,代表实验动物找到平台的时间越短,学习能力越强。本研究结果显示,*Fmr1* KO小鼠第4天的逃避潜伏期明显高于正常野生小鼠,而给予BF839干预后,*Fmr1* KO小鼠第4天的逃避潜伏期明显降低,甚至低于正常野生小鼠。该结果提示BF839早期

干预能逆转*Fmr1* KO小鼠的学习能力至正常野生小鼠水平。“跨越原平台次数”越多,代表实验动物找到平台的次数越多,记忆能力越强。本研究中*Fmr1* KO小鼠穿越原平台次数略低于正常野生小鼠,而给予BF839干预后,*Fmr1* KO小鼠穿越原平台次数明显升高,甚至高于正常野生小鼠。该结果提示BF839早期干预可明显提高*Fmr1* KO小鼠的记忆能力,甚至优于正常野生小鼠。以上结果与Goo等<sup>[16]</sup>发现的使用粪菌移植可以恢复Y迷宫实验中*Fmr1* KO小鼠的学习记忆能力相类似。但是,粪菌移植存在操作复杂、供体筛选困难以及可能移植致病菌等缺陷,本研究所用方法无疑更有便捷性、安全性的优势。

三箱社交实验是最常用于研究实验动物社交行为变化的实验项目。其设计是在实验动物熟悉了环境后,在实验第一阶段检测实验动物靠近位于实验箱中装有熟悉对象的金属笼子的次数和时间,来判断实验动物是否具有社交行为<sup>[14]</sup>。本研究结果显示*Fmr1* KO小鼠与熟悉小鼠接触时间明显低于正常野生小鼠,而给予BF839干预后,虽然能提高

表1 三箱社交实验第一阶段中3组小鼠与熟悉小鼠、金属小球接触次数、接触时间的比较 [ $M(Q_1, Q_3)$ ]

**Tab.1** Comparison of number and times of contacts with familiar mice and metal ball among the 3 groups at the first stage of Three-chamber Social Interaction Test ( $M[Q_1, Q_3]$ )

组别	N1(次)	N2(次)	T1(s)	T2(s)
WT组(n=11)	10.00(8.00, 16.00)	6.00(4.00, 13.00)	168.20(78.00, 273.60)	114.80(63.10, 135.50)
<i>Fmr1</i> KO组(n=15)	14.00(8.50, 20.00)	12.00(3.00, 16.50)	50.50(35.95, 106.18) <sup>a</sup>	22.40(6.80, 40.35) <sup>a</sup>
<i>Fmr1</i> KO+BF839组(n=7)	22.00(15.00, 25.00)	23.00(13.00, 26.00)	92.80(71.00, 115.80)	40.62(25.40, 50.20)
H值	4.763	5.402	7.569	16.340
P值	0.092	0.067	0.023	0.000

因该实验中每只小鼠只能测试1次,不能重复测试,软件在进行轨迹跟踪时产生了很多干扰波段,不能准确获取数据,导致*Fmr1* KO+BF839组中8只小鼠数据缺失;N1:与熟悉小鼠接触次数;N2:与金属小球接触次数;T1:与熟悉小鼠接触时间;T2:与金属小球接触时间;与WT组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$

表2 三箱社交实验第二阶段中3组小鼠与熟悉小鼠、陌生小鼠接触次数、接触时间的比较 [ $M(Q_1, Q_3)$ ]

**Tab.2** Comparison of number and times of contacts with familiar mice and unfamiliar mice among the 3 groups at the second stage of Three-chamber Social Interaction Test ( $M[Q_1, Q_3]$ )

组别	N1(次)	N3(次)	T1(s)	T3(s)
WT组(n=11)	7.00(4.00, 8.00)	7.00(4.00, 17.00)	150.40(43.30, 305.50)	142.00(65.00, 171.60)
<i>Fmr1</i> KO组(n=12)	6.00(3.00, 9.00)	5.50(0.50, 12.75)	14.70(6.40, 161.85) <sup>a</sup>	9.50(0.50, 41.95) <sup>a</sup>
<i>Fmr1</i> KO+BF839组(n=14)	5.00(3.00, 6.00)	23.00(16.00, 36.00) <sup>ab</sup>	23.40(18.80, 27.40) <sup>a</sup>	69.60(50.40, 98.40) <sup>b</sup>
H值	0.075	19.069	6.892	12.902
P值	0.963	0.000	0.032	0.002

因该实验中每只小鼠只能测试1次,不能重复测试,软件在进行轨迹跟踪时产生了很多干扰波段,不能准确获取数据,分别导致*Fmr1* KO组3只小鼠和*Fmr1* KO+BF839组1只小鼠数据缺失;N1:与熟悉小鼠接触次数;N3:与陌生小鼠接触次数;T1:与熟悉小鼠接触时间;T3:与陌生小鼠接触时间;与WT组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与*Fmr1* KO组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

*Fmr1* KO 小鼠与熟悉小鼠接触时间,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。该结果提示 *Fmr1* KO 小鼠存在较弱的社交行为,而 BF839 虽然不能明显增强其社交行为,但却有较弱的改善作用。在实验第二阶段中,通过检测实验动物靠近关有陌生对象的金属笼子的次数及时间,来判断实验动物的社交新奇偏好能力<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, *Fmr1* KO 小鼠与陌生小鼠接触时间明显少于正常野生小鼠,而给予 BF839 干预后, *Fmr1* KO 小鼠与陌生小鼠接触次数、接触时间均明显增多,其中接触次数甚至多于正常野生小鼠,而接触时间虽然少于正常野生小鼠,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。该结果提示, *Fmr1* KO 小鼠的社交新奇偏好能力弱于正常野生小鼠,与以往 Luo 等<sup>[14]</sup>、陈锡等<sup>[17]</sup>的研究结果相一致,而 BF839 干预能逆转 *Fmr1* KO 小鼠的社交新奇偏好能力,甚至恢复至正常野生小鼠水平。值得指出的是,既往 Hsiao 等<sup>[8]</sup>发现用脆弱拟杆菌 NCTC9343 治疗后可以改善 MIA 后代小鼠的刻板、焦虑行为,但不能改善其社交行为和社交新奇偏好能力。本研究的结果优于 Hsiao 等<sup>[8]</sup>的报道,其原因可能是本研究使用的菌株的功效更强,但也可能与使用的动物模型不一致有关。

目前关于肠道菌群通过脑肠轴调节大脑活动和行为的分子机制尚不明确,但越来越多的证据表明免疫反应的失调导致了 FGS 或孤独症。如有研究发现与 WT 小鼠相比, *Fmr1* KO 小鼠的皮层和海马中肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  水平明显升高,而粪菌移植可降低其水平至野生状态<sup>[16]</sup>。更有研究发现脆弱拟杆菌 BF839 在人体淋巴细胞转化实验和 E 玫瑰花环实验中提高了转化阳性率,推测 BF839 的疗效也可能与其免疫调节作用有关<sup>[10]</sup>。此外, Hsiao 等<sup>[8]</sup>的研究也提示脆弱拟杆菌 NCTC9343 可通过改变代谢物 4-乙基苯硫酸盐/酯(4EPS)、吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸的代谢,从而纠正 MIA 后代小鼠的焦虑样行为,同时,这些代谢物也可影响血清 5-羟色胺(5-HT) 水平变化,从而影响海马的学习记忆能力。本课题组下一步也将开展 BF839 干预后小鼠脑组织中干扰素- $\gamma$ 、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、p40 和 TNF- $\alpha$  等炎性细胞因子以及血清、脑部 5-HT 水平变化的检测,并用共聚焦显微镜扫描三维重构的神经元形态,分析树突发育和树突棘形态的改变,深入探讨肠道菌群干预产生效果的可能免疫机制及其对小鼠神经发育的影响。

综上所述,本研究发现 BF839 早期干预能明显提高 *Fmr1* KO 小鼠的学习记忆能力及社交新奇偏

好能力,甚至恢复至正常水平,并且,由于这是一个已上市 20 年的成熟产品,安全性有保证,故可迅速开展进一步的相关临床研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 感谢荷兰伊拉斯塔斯大学细胞生物学及遗传学研究中心 Oostra BA 教授惠赠的实验小鼠

## 参 考 文 献

- [1] Bostrom C, Yau SY, Majaess N, et al. Hippocampal dysfunction and cognitive impairment in fragile-X syndrome[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2016, 68: 563-574. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.06.033.
- [2] Wadell PM, Hagerman RJ, Hessl DR. Fragile X syndrome: psychiatric manifestations, assessment and emerging therapies[J]. Curr Psychiatry Rev, 2013, 9(1): 53-58. DOI: 10.2174/157340013805289644.
- [3] 马云, 李婉睿, 刘伊煊, 等. 脆性 X 综合征致病机理与治疗[J]. 生命的化学, 2020, 40(2): 192-197. DOI: 10.13488/j.smhx.20190402.
- [4] Ma Y, Li WR, Liu YX, et al. Pathogenesis and treatment of fragile X syndrome[J]. Chemistry of Life, 2020, 40(2): 192-197. DOI: 10.13488/j.smhx.20190402.
- [5] Bernardet M, Crusio WE. *Fmr1* KO mice as a possible model of autistic features[J]. Scientific World Journal, 2006, 6: 1164-1176. DOI: 10.1100/tsw.2006.220.
- [6] Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, et al. The microbiota-gut-brain axis[J]. Physiol Rev, 2019, 99(4): 1877-2013. DOI: 10.1152/physrev.00018.2018.
- [7] 赵会君, 彭丽华, 任荣荣, 等. 粪微生态制品移植治疗孤独症病例报道[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(3): 309-312. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.201703014.
- [8] Zhao HJ, Peng LH, Ren RR, et al. Treatment of a case of ASD with fecal microbiota transplantation[J]. Chin J Microecol, 2017, 29(3): 309-312. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.201703014.
- [9] 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. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-5820.2020.03.007.
- [10] OuYang YY, Chen SQ, Tian LR, et al. Analysis of intestinal flora composition in *Fmr1* knockout mice[J]. Chin J Clin Lab Mgt (Electronic Edition), 2020, 8(3): 158-165. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-5820.2020.03.007.
- [11] Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. Microbiota modulates behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders[J]. Cell, 2013, 155(7): 1451-1463. DOI: 10.1016/j.cell.2013.11.024.
- [12] 张季阶, 于丽娴, 徐灵芝, 等. 一株无毒脆弱拟杆菌的分离鉴定[J]. 宁夏医学杂志, 1991, 13(4): 216-218.
- [13] Zhang JJ, Yu LX, Xu LZ, et al. Isolation and identification of a non-toxic bacteroides fragilis strain[J]. Ningxia Medical Journal, 1991, 13(4): 216-218.
- [14] 张季阶, 张洪梅, 张翼, 等. 脆弱拟杆菌(BF839)菌液的临床应用研究[J]. 中国生物制品学杂志, 1995, 8(2): 63-65.
- [15] Zhang JJ, Zhang HM, Zhang Y, et al. Clinical application of

- bacteroides fragilis (BF839) bacterial fluid[J]. Chinese Journal of Biologicals, 1995, 8(2): 63-65.
- [11] 邓宇虹, 林楚慧, 操德智. 脆弱拟杆菌(BF839)辅助治疗难治性癫痫有效性的初步临床研究[J]. 癫痫杂志, 2021, 7(4): 288-295. DOI: 10.7507/2096-0247.20210046.
- Deng YH, Lin CH, Cao DZ. The beneficial effect of bacteroides fragilis (BF839) as a supplementary treatment in drug-resistant epilepsy: a pilot study[J]. J Epilepsy, 2021, 7(4): 288-295. DOI: 10.7507/2096-0247.20210046.
- [12] 邢州, 孙卫文, 黄越玲, 等. 30日龄FMR1基因敲除小鼠的旷场行为观察[J]. 解剖学研究, 2009, 31(2): 109-113.
- Xing Z, Sun WW, Huang YL, et al. Behavioural comparision on FMR1 knockout mice at 30 days age in open field test[J]. Anat Res, 2009, 31(2): 109-113.
- [13] Mineur YS, Sluyter F, de Wit S, et al. Behavioral and neuroanatomical characterization of the Fmr1 knockout mouse[J]. Hippocampus, 2002, 12(1): 39-46. DOI: 10.1002/hipo.10005.
- [14] Luo CW, Deng XY, Cheng JL, et al. Altered anxiety and social behaviors in a mouse model of fragile X syndrome treated with hyperbaric oxygen therapy[J]. J Clin Neurosci, 2020, 73: 245-251.
- [15] 陈罗西, 郭玲玲, 李亮. Morris圆形水迷宫的应用及其相关检测指标分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(8): 55-57. DOI: 10.3969/j.issn.1673-842X.2008.08.029.
- Chen LX, Guo LL, Li Liang. Clinical observation on hyposomnia of liver fire harassing the heart type by genfianae decoction for purging liver fire[J]. Journal of Liaoning University of TCM, 2008, 10(8): 55-57. DOI: 10.3969/j.issn.1673-842X.2008.08.029.
- [16] Goo N, Bae HJ, Park K, et al. The effect of fecal microbiota transplantation on autistic-like behaviors in Fmr1 KO mice[J]. Life Sci, 2020, 262: 118497. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118497.
- [17] 陈锡, 陈楚茂, 许宏烽, 等. Fmr1基因敲除小鼠的三箱社交新奇偏好行为观察[J]. 现代医院, 2018, 18(8): 1185-1187. DOI: 10.3969/j.issn.1671-332X.2018.08.027.
- Chen X, Chen CM, Xu HF, et al. The observation of social novel preference on Fmr1 knockout mice in three-chamber experiment [J]. Modern Hospital, 2018, 18(8): DOI: 10.3969/j. issn. 1671-332X.2018.08.027.

(收稿日期:2021-12-20)

(本文编辑:刘凯)

## · 读者·作者·编者 ·

### 本刊法定计量单位书写的规范化要求

根据《中华人民共和国法定计量单位》和《中华人民共和国法定计量单位使用方法》的规定,结合本刊文稿中常见的一些不妥情况,将计量单位的书写规范介绍如下。

- 各种量和单位除在无数值的叙述性文字中可使用中文符号外,均应使用量和单位的国际符号,非物理量的单位(例如个、次、件等)用中文表示。
- 单位名称与单位符号不能混用,如: $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{天}^{-1}$ 是混用形式,应改为 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。
- 在一个组合的单位符合号中,表示相除的斜线不应多于1条,如: $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ 应改为 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 或 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。
- 在一个组合单位中,表示相除的斜线和负数幂也不能混用,如: $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}^{-1}$ 的写法也是错误的,应改为 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 或 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。
- 表示离心加速作用时,应以重力加速度( $g$ )的倍数的形式表达,例如: $6000\times g$ 离心10 min,或者在给出离心机转速的同时给出离心半径,例如:离心半径8 cm,12 000 r/min 离心5 min。
- 在医学文稿中人体及动物体内的压力单位推荐使用kPa,暂可使用mm Hg或cm H<sub>2</sub>O,但是在文中首次出现时应标注出与法定压力单位(Pa)的换算关系,如1 mm Hg=0.133 kPa或1 cm H<sub>2</sub>O≈0.098 kPa。
- 时间表示方法均应采用d、h、min、s,而不能用天、小时、分钟、秒。但在描述第×天、第×小时、第×分钟时,不可用第×h、第×d、第×min。
- 量的符号,一律用字母斜体表示,如吸光度(旧称光密度)的符号应写作英文字母大写A(斜体),而不是A(正体)。
- 在书写含有单位符号的数据时,两者间应空半个字符的距离,如:10.3cm、0.133kPa等都不是规范化书写方式,正确的写法应该是10.3 cm和0.133 kPa。
- 不能把ppm、pphm、ppb等缩写词作为单位使用。
- 文章中出现百分数时应注明是体积分数还是质量分数,或者转换为质量浓度。如:体积分数为0.02(或2%)的二氧化硫;质量分数为0.05(或5%)的硫酸。物质的量浓度:单位为mol/mL或mol/L。质量浓度:单位为g/L。