

肠道菌群代谢物 TMAO 上调 NLRP3 炎性小体： 海马相关认知障碍致病机制的研究

杨梅芳^{1,2}, 陈治任¹, 周紫璇^{1,2}, 陈巍巍^{1,2,3*}

(1. 徐州医科大学徐州临床学院, 江苏 徐州 221000; 2. 徐州市中心医院神经内科, 江苏 徐州 221000;
3. 徐州市医学科学研究所, 江苏 徐州 221000)

摘要:目的 探究肠道菌群代谢物三甲胺 N-氧化物(TMAO)介导神经炎症反应在认知功能障碍中的潜在作用。方法 将小鼠随机分为对照组、TMAO 组、TMAO+DMB 组。TMAO 组小鼠经 TMAO 和高胆碱高脂饲料联合喂养 6 周, TMAO+DMB 组在此基础上同时喂养 TMAO 抑制剂 4,4'-二氨基-3,3'-二甲基联苯(DMB)6 周。Western blot 检测小鼠双侧海马中 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)、半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)蛋白水平;焦油紫染色观察小鼠海马 CA1 区神经元形态及存活情况;水迷宫实验评估小鼠学习记忆能力。结果 与对照组相比, TMAO 组小鼠海马组织内 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 蛋白表达明显增加($P < 0.05$), CA1 区神经元大量死亡, 学习记忆能力受损;DMB 抑制 TMAO 后, TMAO+DMB 组小鼠海马组织中 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$), CA1 区神经元死亡率下降, 损伤减轻($P < 0.05$), 学习记忆能力得到改善。结论 肠道菌群代谢产物 TMAO 通过上调 NLRP3 炎性小体介导海马组织慢性炎症反应, 加重 CA1 区神经元损伤, 导致学习记忆能力减退, 加剧认知功能障碍。

关键词:肠道菌群代谢物;三甲胺 N-氧化物;NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3;海马体;认知功能障碍

中图分类号:R741.02 **文献标志码:**A **文章编号:**2096-3882(2025)02-0088-05

DOI:10.12467/j.issn.2096-3882.20240900

Role of gut microbiota metabolite TMAO in upregulating NLRP3 inflammasome: a study on the pathogenesis of hippocampus-related cognitive impairment

YANG Meifang^{1,2}, CHEN Zhiren¹, ZHOU Zixuan^{1,2}, CHEN Weiwei^{1,2,3*}

(1. Xuzhou Clinical College of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China;
2. Department of Neurology, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221000;
3. Xuzhou Medical Science Research Institute, Xuzhou, Jiangsu 221000)

Abstract: Objective To explore the potential role of the gut microbiota metabolite trimethylamine N-oxide (TMAO) in mediating neuroinflammatory responses in cognitive impairment. **Methods** Mice were randomly divided into three groups: control, TMAO, and TMAO + DMB. The TMAO group was fed a high-choline, high-fat diet combined with TMAO for six weeks, while the TMAO + DMB group received the same diet along with TMAO inhibitor 4,4'-diamino-3,3'-dimethylbiphenyl (DMB) for six weeks. The levels of NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), caspase-1, and interleukin-1 β (IL-1 β) in the bilateral hippocampus of the mice were detected by Western blot. The morphology and survival of neurons in hippocampal CA1 region was observed by Cresyl violet staining. The Morris water maze test was used to evaluate learning and memory abilities. **Results** Compared with the control group, the TMAO group showed significantly increased expression of NLRP3, caspase-1, and IL-1 β proteins in the hippocampal tissues ($P < 0.05$), and exhibited excessive neuron deaths in the CA1 region, with impaired learning and memory abilities. After TMAO inhibition with DMB, the TMAO + DMB group showed significantly reduced levels of NLRP3, caspase-1, and IL-1 β proteins in the hippocampus ($P < 0.05$), and exhibited decreases in neuron death rate, indicating alleviated damage ($P < 0.05$), with improved learning and memory abilities. **Conclusions** The gut microbiota metabolite TMAO

基金项目:国家自然科学基金(81501138);江苏省中医药科技发展计划项目(MS2022067);江苏省研究生科研与实践
创新计划项目(SJ CX23_1402, SICX241550);徐州市科技局项目(KC23072)

* 通信作者, E-mail: xzweiwei@njmu.edu.cn

exacerbates chronic inflammatory responses in the hippocampus by upregulating the NLRP3 inflammasome, which leads to increased neuronal damage in the CA1 region, and impaired learning and memory, ultimately worsening cognitive dysfunction.

Key words: gut microbiota metabolites; trimethylamine N-oxide; NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; hippocampus; cognitive impairment

随着人口老龄化,我国认知障碍发病率日益升高,给家庭和社会带来了沉重负担,成为临床亟待解决的关键问题。认知障碍根据发病机制分为退行性和获得性两类,其中获得性认知障碍涉及多因素、多环节的病理过程,神经炎症是其主要诱因之一。近期研究表明,认知障碍伴随慢性炎症反应,神经炎症因子释放和免疫细胞因子激活影响神经功能、突触可塑性及神经元调节,进而干扰学习和记忆^[1-4]。NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)炎性小体可识别病原相关分子模式(PAMPs)和宿主来源的危险信号分子模式(DAMPs),在神经炎症中起着关键作用。肠道菌群与大脑通过免疫、激素及代谢等途径双向交流,构成“肠-脑轴”^[5]。三甲胺N-氧化物(TMAO)是一种肠道菌群代谢产物,研究发现其水平在随自然年龄增长所致认知功能障碍患者中升高,能诱导线粒体功能障碍、氧化应激、神经元退化和大脑突触损伤,加重认知障碍^[6-7]。本研究以TMAO和高脂高胆碱饲料联合喂养小鼠,探究TMAO是否通过NLRP3炎性小体对认知功能障碍产生调控作用,以期对认知障碍的治疗寻找潜在靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物 实验采用4周龄C57BL/6J雄性小鼠,由徐州医科大学实验动物中心提供。起初以普通饲料喂养。随后,为促进体内TMAO转化,小鼠予以0.12%TMAO饮水+含1%胆碱^[8-9]高脂高胆碱饲料(济南朋悦实验动物有限公司提供,配方:基础饲料73%、猪油20%、蔗糖4%、胆固醇1%、奶粉2%、胆碱1%)喂养6周。TMAO抑制剂4,4'-二氨基-3,3'-二甲基联苯(DMB)以1%浓度通过饮水添加,干预6周。小鼠饲养于通风良好的清洁环境,室温维持在22℃,相对湿度(55±5)%,自由进食饮水,严格遵循昼夜节律。

1.2 主要试剂 NLRP3抗体购自Thermo Fisher公司,caspase-1抗体、IL-1β抗体购自Santa Cruz公司、β-actin抗体购自Proteintech公司,TMAO、胆碱、焦油紫粉末、DMB购自Sigma公司,BCA蛋白浓度试剂盒、SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒购自碧云天

公司。

1.3 方法

1.3.1 组织样品处理 用1.5%戊巴比妥钠麻醉小鼠,断头后快速分离小鼠双侧海马CA1区,加入含有蛋白酶抑制剂的组织裂解液,匀浆取上清,用BCA法测蛋白浓度后配置成等浓度的蛋白样品体系,用于免疫印迹检测(Western blot)。

1.3.2 Western blot 配制10孔10%、12%的SDS-PAGE凝胶,每孔上样100 μg蛋白。在80 V和100 V恒压下完成电泳,将目的蛋白转至PVDF膜,用5%脱脂奶粉室温封闭1 h,TBST洗膜3次,每次10 min。一抗4℃孵育过夜,次日洗膜后加入二抗,室温摇床上孵育1 h后洗膜3次。采用超敏ECL化学发光试剂盒,于暗室曝光显影并采集图像,用Image J软件分析图像。

1.3.3 小鼠灌注取脑及冰冻切片 用1.5%戊巴比妥钠麻醉小鼠,开胸暴露心脏,将针尖自心尖部插入左心室至升主动脉。先用80 ml生理盐水快速冲洗组织血液,再缓慢灌注4%多聚甲醛60 ml。灌注后小鼠断头取脑,置于4%多聚甲醛固定24 h。随后,将脑组织先后置于20%、30%蔗糖溶液中脱水,待脑组织沉淀,表明脱水彻底。用刀片修剪脑块后置于冻台上,滴加OCT包埋液,放入冰冻切片机快速降温速冻,待OCT完全凝固、脑组织变硬,以10 μm厚度切片。

1.3.4 焦油紫染色 配置1%的焦油紫染色液,将载有脑组织的玻片依次经100%、95%、90%、80%、70%乙醇梯度脱水,随后浸入焦油紫染色液染色。染色后玻片依次在70%、80%、90%、95%、100%乙醇中分色,在光学显微镜下,当神经元呈紫色而背景基本无色时,表明分色良好。分色后玻片置于二甲苯中透明,中性树脂封片,高倍镜下观察海马CA1区的神经元形态,并统计1 mm²内成活神经元密度。

1.3.5 Morris水迷宫(MWM)实验 小鼠经TMAO+高脂高胆碱饲料^[9-11]喂养6周后进行水迷宫行为学实验,为期6 d。实验采用直径120 cm,深30 cm的圆形游泳池,水深约24 cm。温度保持在20~21℃。目标象限中心设有直径12 cm,高23 cm的

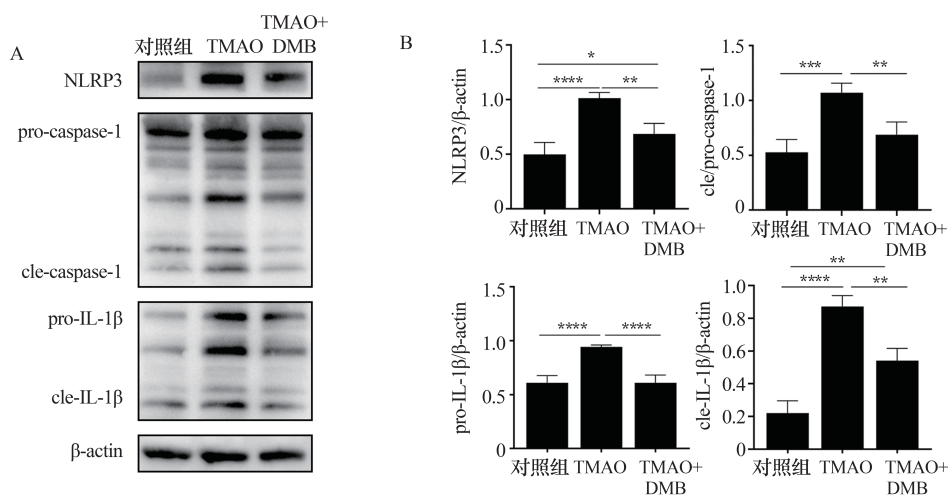
圆形平台,位于水面以下 1 cm 处。适应期:第一天将各组小鼠放入泳池 60 s,使其适应水温及环境,同时统计游泳速度,确认无统计学差异后进入逃避潜伏期阶段。逃避潜伏期训练:小鼠从 4 个不同位置面朝池壁入水,软件记录 60 s 后的游泳轨迹。若小鼠爬上平台并停留超 10 s,认为发现平台,记录从离开到平台的时间,即逃避潜伏期;如小鼠在记录期间没有定位平台,则逃避潜伏期为 60 s,连续训练 4 d。空间探索试验:第 5 天取下平台,选择平台对侧象限为入水点,小鼠面对池壁放入池中自由游动 60 s,记录运动情况。

1.4 统计学处理 所有数据及图像均采用 SPSS 23.0、Image J 软件进行处理分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$

表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TMAO 参与调控小鼠海马组织中 NLRP3 炎性小体介导的炎症反应 与对照组相比,TMAO 喂养 6 周后小鼠的炎症反应相关蛋白 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。DMB 抑制 TMAO 后,TMAO+DMB 组小鼠 NLRP3 炎性相关蛋白及其下游 caspase-1、IL-1 β 炎性细胞因子水平显著降低($P < 0.05$)。表明 TMAO 上调小鼠海马组织中 NLRP3 炎性小体介导的炎症反应。见图 1。



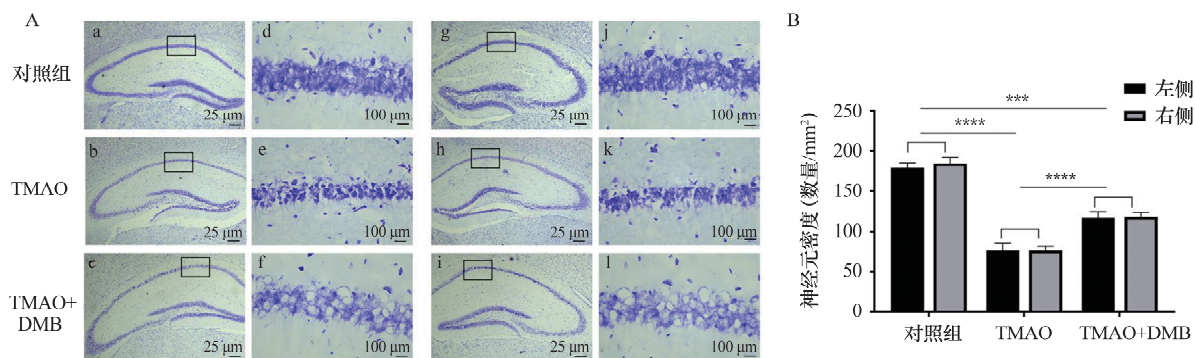
A. Western blot 检测 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 蛋白水平;B. 灰度值分析(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$)

图 1 TMAO 上调小鼠海马组织中 NLRP3 炎性蛋白及其下游炎性因子表达

2.2 TMAO 诱导炎症反应加重小鼠海马 CA1 区神经元损伤 结果显示,对照组小鼠海马 CA1 区神经元分层排列,呈圆形、染色浅、可见核仁(图 2Ag,j),而 TMAO 组小鼠海马 CA1 区神经元大量死亡,数目减少,存活率明显下降,部分神经元轮廓不清且尼氏体模糊,呈现核固缩(图 2Ah,k);TMAO+DMB 组神经元呈不规则深色,细胞核、核仁不可见(图 2Ai,l),存活神经元数量较 TMAO 组明显增加($P < 0.05$,图 2B)。

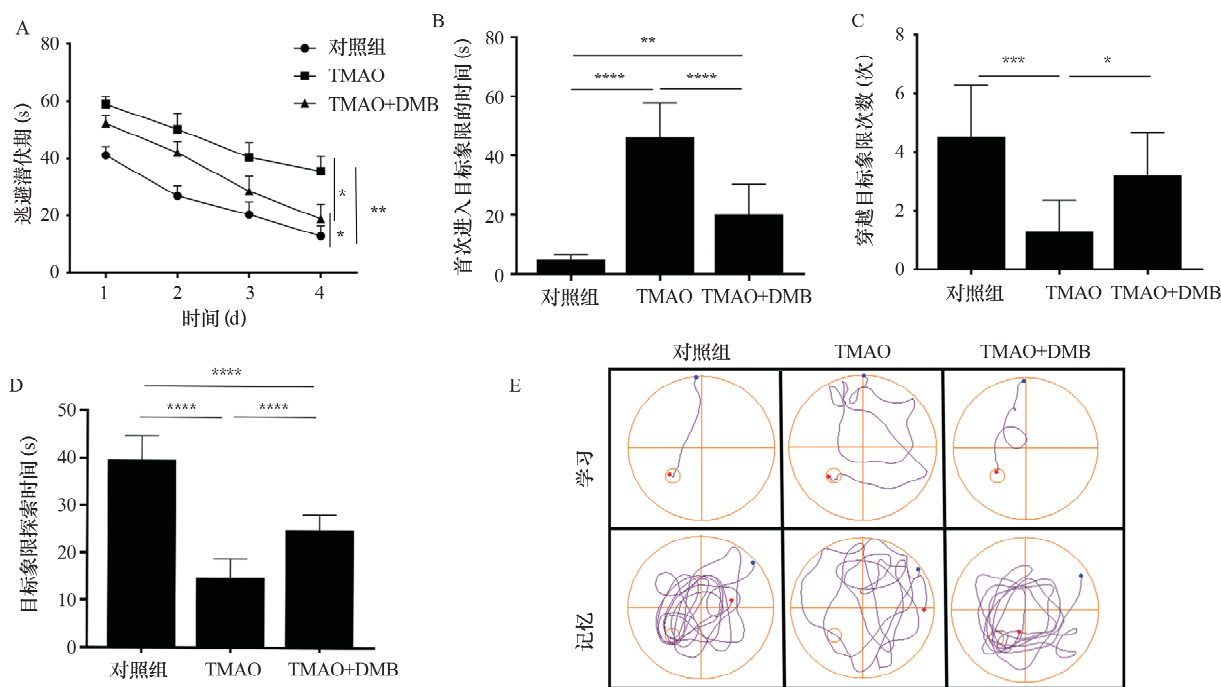
2.3 TMAO 对小鼠海马组织学习记忆及认知功能的影响 与对照组相比,TMAO 组训练阶段(1~4 d)逃避潜伏期显著延长($P < 0.05$,图 3A),空间探索阶段首次进入目标象限用时最长,穿越目标象限次数最少,在目标象限探索时间最少($P < 0.05$,图 3B-D)。学习轨迹图显示,对照组能够用最短的距

离直接找到平台,而 TMAO 组小鼠对平台的方位无明确感知,运动距离和时间花费较长,提示 TMAO 喂养小鼠的学习能力严重下降。记忆轨迹图显示 TMAO 组小鼠无明显的探索策略或在与目标象限相反的方向探索,且运动距离较长、运动轨迹繁杂,提示 TMAO 组小鼠的记忆能力显著损害。DMB 抑制 TMAO 后,小鼠训练阶段逃避潜伏期、首次进入目标象限时间均缩短,穿越目标象限次数增加,小鼠在目标象限探索的时间延长($P < 0.05$,图 3B-E),TMAO+DMB 组小鼠运动轨迹虽长于对照组,但主要集中在目标象限内及附近。因此,肠道菌群代谢物 TMAO 破坏小鼠海马组织后进一步损害其学习和记忆能力,加剧认知功能障碍,通过 DMB 对 TMAO 的抑制作用,能够改善小鼠的学习记忆能力。



A. CA1 区神经元焦油紫染色 (a-c、g-i 为左侧海马, d-f、j-l 为右侧海马); B. CA1 区存活神经元密度 (** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$)

图2 TMAO 介导炎症反应对小鼠海马神经元形态及数量的影响



A. 逃避潜伏期; B. 首次进入目标象限的时间; C. 穿越目标象限次数; D. 目标象限探索时间 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$); E. 水迷宫轨迹图

图3 TMAO 对小鼠海马组织学习记忆及认知功能的影响

3 讨论

获得性认知障碍在认知障碍中占比较高,尤其在成年和老年群体中更为突出。饮食对大脑健康的潜在影响备受关注,但饮食成分在认知下降和痴呆中的作用尚不明确。当脑卒中、创伤性脑损伤、感染、酗酒或药物滥用等常见因素引起脑部病变,若病变累及大脑皮质、海马体等关键脑区,会损伤神经元结构和功能,使信息处理和记忆功能障碍,导致认知能力的全面下降。认知功能下降与衰老过程中的异常自噬、线粒体功能障碍、细胞衰老、表观遗传学改变、脑血管功

能障碍和脂质失衡密切相关^[8-11],但机制未完全明确,临床上尚不可完全治愈,早诊早治对改善患者预后至关重要。最新研究表明,神经炎症参与了多种认知功能障碍相关中枢系统疾病发病及认知功能调节。本实验研究了肠道菌群代谢物 TMAO 在调节神经炎症和认知功能中的潜在作用,旨在探究肠道菌群对认知障碍的调节功能,为认知功能障碍相关中枢神经系统疾病寻找新的靶点和预测指标。

TMAO 在“肠-脑轴”中备受关注。日常饮食中的磷脂酰胆碱和左旋肉碱经肠道菌群代谢为三甲胺(TMA),TMA 入血后在肝脏氧化为 TMAO。临床研

究表明,轻度认知功能障碍和阿尔茨海默病患者脑脊液中 TMAO 水平较高,且与病理标志物和神经元变性相关^[12]。血浆和大脑中的 TMAO 升高可刺激星形胶质细胞,导致神经炎症并降低认知功能^[13],说明肠道微生物群可能是改善认知功能障碍的潜在治疗靶点,有望成为生物医学治疗的一个方向。

NLRP3 炎性小体作为先天免疫系统的重要组成部分,在炎症反应的激活过程中发挥关键作用。NLRP3 炎性小体的激活可招募并激活 caspase-1,促使成熟的 IL-1 β 和 IL-18 分泌,推动先天免疫细胞聚集,启动下游炎症级联反应,引发细胞损伤^[14]。神经炎症是认知老化和神经功能退化的重要介质^[4]。近期研究发现,慢性脑灌注作为血管性认知功能障碍的关键过程,能够激活 NLRP3 炎性小体,介导炎症反应和神经元焦亡,加重认知损伤^[15]。不仅如此,慢性睡眠剥夺诱发的认知障碍会通过激活肠内的 NLRP3 炎性小体,破坏肠道屏障,释放炎症因子,进一步激活中枢神经系统中的 NLRP3 炎性小体,加剧突触功能和认知功能障碍^[16]。糖尿病相关认知障碍的研究显示,小胶质细胞作为神经炎症的载体,能够积累裂解激活蛋白,直接激活高尔基体内的 NLRP3 炎性小体,放大神经炎症,促使神经元损伤,认知能力下降^[17]。目前,NLRP3 与认知功能障碍之间的紧密关联已得到证实,但其上游驱动因素尚未阐明。本研究发现,TMAO 参与了小鼠海马组织中 NLRP3 炎性小体介导的炎症反应调控过程;当应用 TMAO 抑制剂 DMB 下调 TMAO 水平后,NLRP3 蛋白及其下游炎症因子水平显著降低,海马 CA1 区存活神经元数量明显增加,小鼠学习记忆能力得到改善。

综上,肠道菌群代谢产物 TMAO 通过 NLRP3 炎性小体介导海马组织慢性炎症反应,加重 CA1 区神经元损伤,导致学习记忆能力减退,加剧认知功能障碍。减少富含脂肪和胆碱的食物摄入,调控肠道微生物群组成,或许是治疗认知障碍的新思路,检测肠道菌群及其代谢产物含量,有望成为辅助预测认知功能障碍的新指标。

参考文献:

- [1] Gulen MF, Samson N, Keller A, et al. cGAS-STING drives ageing-related inflammation and neurodegeneration [J]. *Nature*, 2023, 620 (7973):374-380.
- [2] Cornell J, Salinas S, Huang HY, et al. Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(4):705-716.

- [3] Yang RC, Yang B, Liu W, et al. Emerging role of non-coding RNAs in neuroinflammation mediated by microglia and astrocytes [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1):173.
- [4] Poh L, Sim WL, Jo DG, et al. The role of inflammasomes in vascular cognitive impairment [J]. *Mol Neurodegener*, 2022, 17(1):4.
- [5] Agirman G, Yu KB, Hsiao EY. Signaling inflammation across the gut-brain axis [J]. *Science*, 2021, 374(6571):1087-1092.
- [6] Deng Y, Zou JQ, Hong Y, et al. Higher circulating trimethylamine N-oxide aggravates cognitive impairment probably *via* downregulating hippocampal SIRT1 in vascular dementia rats [J]. *Cells*, 2022, 11(22):3650.
- [7] Praveenraj SS, Sonali S, Anand N, et al. The role of a gut microbial-derived metabolite, trimethylamine N-oxide (TMAO), in neurological disorders [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(11):6684-6700.
- [8] Zhu WF, Romano KA, Li L, et al. Gut microbes impact stroke severity *via* the trimethylamine N-oxide pathway [J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(7):1199-1208.
- [9] Chen YY, Weng ZK, Liu Q, et al. FMO3 and its metabolite TMAO contribute to the formation of gallstones [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(10):2576-2585.
- [10] Li Q, Zhao YJ, Guo HY, et al. Impaired lipophagy induced-microglial lipid droplets accumulation contributes to the buildup of TREM1 in diabetes-associated cognitive impairment [J]. *Autophagy*, 2023, 19(10):2639-2656.
- [11] Rump K, Adamzik M. Epigenetic mechanisms of postoperative cognitive impairment induced by anesthesia and neuroinflammation [J]. *Cells*, 2022, 11(19):2954.
- [12] Vogt NM, Romano KA, Darst BF, et al. The gut microbiota-derived metabolite trimethylamine N-oxide is elevated in Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2018, 10(1):124.
- [13] Brunt VE, LaRocca TJ, Bazzoni AE, et al. The gut microbiome-derived metabolite trimethylamine N-oxide modulates neuroinflammation and cognitive function with aging [J]. *Geroscience*, 2021, 43(1):377-394.
- [14] Fu JN, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41:301-316.
- [15] Zhang YX, Zhang JW, Zhao Y, et al. ChemR23 activation attenuates cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfusion by inhibiting NLRP3 inflammasome-induced neuronal pyroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(11):721.
- [16] Zhao N, Chen QG, Chen X, et al. Intestinal dysbiosis mediates cognitive impairment *via* the intestine and brain NLRP3 inflammasome activation in chronic sleep deprivation [J]. *Brain Behav Immun*, 2023, 108:98-117.
- [17] Zhu WW, Zhang HQ, Niu T, et al. Microglial SCAP deficiency protects against diabetes-associated cognitive impairment through inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation [J]. *Brain Behav Immun*, 2024, 119:154-170.

收稿日期:2024-11-11 修回日期:2025-02-14

本文编辑:王卿