

· 全健康 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240040



主持人: 韩 谦、刘萌萌

槟榔碱对SD大鼠肠道微生物与神经递质的影响

王傲雪, 赵 超

(海南大学 药学院/热带生物资源教育部重点实验室, 海口 570228)

摘 要: 为了解槟榔碱对SD大鼠肠道微生物与神经递质的影响, 连续28 d用含500、100、0 (CK) $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 氢溴酸槟榔碱的0.9% NaCl溶液分别灌胃SD大鼠, 然后检测分析SD大鼠结肠内容物中肠道微生物、粪便中短链脂肪酸的含量、脑皮质与血清中神经递质的含量等。结果发现, 槟榔碱促使SD大鼠肠道内乳酸杆菌属、双歧杆菌属等的相对丰度提高, 肠道内乙酸、丙酸等的含量增加, 促进脑皮质中兴奋性神经递质DA和5-HT等含量增加、降低了抑制性神经递质GABA的含量, 表明槟榔碱可以通过微生物-肠-脑调节SD大鼠的生理、行为, 使SD大鼠出现好动、食欲下降、体质量降低等现象。

关键词: 槟榔碱; 肠道微生物; 神经递质; 微生物-肠-脑轴

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054 (2024) 05-0567-10

王傲雪, 赵超. 槟榔碱对SD大鼠肠道微生物与神经递质的影响 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(5): 567-576. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240040

肠道微生物, 以细菌群体为主导, 构成了机体庞大、复杂的微生态系统。肠道微生物与宿主的健康密切相关, 在肠道营养吸收、运动调节等方面发挥重要作用。当它们的组成、数量和种类出现变动时, 可能会导致各种行为或疾病的发生发展。肠道微生物可代谢产生短链脂肪酸 (Short-chain fatty acids, SCFAs)、神经递质等信号分子。三者通过微生物-肠-脑轴 (microbiota-gut-brain axis, MGBA) 相互影响, 参与调节免疫系统、肠神经系统等中枢神经系统的调节, 对宿主情绪、认知等方面产生影响^[1]。健康人体内肠道微生物发酵产生的SCFAs主要是乙酸、丙酸、丁酸, 占总SCFAs的86%左右, 三者的比例相对固定 (体积比约为3:1:1)^[2]。乙酸主要由拟杆菌属、双歧杆菌属等产生, 丙酸主要由拟杆菌属、梭菌属发酵产生, 丁酸主要由拟杆菌属、真杆菌属等产生^[3-6]。SCFAs能影响肠道运动、改善肠道功能、为肠上皮细胞提供营养、维持结肠稳态, 还能穿过血脑屏障、刺激迷走神经、影响神经免疫与内分泌调节、进而影响神经递质水平^[7]。神经递

质包括谷氨酸 (Glu)、天冬氨酸 (Asp)、多巴胺 (DA) 等, 在神经细胞之间传递信息, 具有维持大脑中枢系统正常活性、调节和控制机体情绪和行为的作用^[8], 已发现神经递质水平异常与许多神经系统性疾病密切相关^[9-11]。肠道微生物 (如乳酸杆菌、双歧杆菌等) 可以代谢产生神经递质及其前体物质, 并通过MGBA影响机体情绪、胃肠道运动等。比如, 5-羟色胺 (5-HT) 是MGBA的关键信号分子之一, 胃肠道产生全身95%的5-HT, 能使机体产生愉悦情绪。肠道微生物可影响5-HT合成的前体物质-色氨酸 (Trp), 从而影响5-HT含量, 参与大脑功能的调节^[12]。

槟榔 (*Areca catechu* L.) 是治疗肠道疾病的传统南药, 能够促进肠道蠕动、改善消化道功能^[13]。人食用槟榔可使中枢神经系兴奋^[14]。槟榔碱是槟榔的主要药理成分, 目前, 槟榔碱调节肠道功能及神经兴奋中的机制尚不明确。本研究通过对SD大鼠灌胃氢溴酸槟榔碱 (arecoline hydrobromide, Ah), 研究槟榔碱对肠道微生物、SCFAs、神经递质的影

收稿日期: 2024-03-12

修回日期: 2024-05-09

第一作者: 王傲雪 (1999-), 女, 海南大学药学院2021级硕士研究生。E-mail: wax15595750895@163.com

通信作者: 赵超 (1977-), 女, 副教授, 硕士研究生导师。研究方向: 微生物产物分析。E-mail: 244062891@qq.com

响,探讨槟榔碱基于微生物-肠-脑轴调节机体生理代谢与行为机制,旨在为槟榔碱的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 SD大鼠(体质量约250 g)、雄性、8周龄、SPF级,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[许可证号SCXK(湘)2019-000],24℃培养,自然光照与黑暗,自由取食与饮水。

槟榔碱性质不稳定,氢溴酸槟榔碱(arcoline hydrobromide, Ah)是槟榔碱稳定存在的形式。氢溴酸槟榔碱($C_8H_{14}BrNO_2$,批号C14930622,含量98%)购自上海源叶生物科技有限公司;SCFAs混合酸标准品(Sigma,上海叶源,GC);Qiagen 51504粪便基因组DNA提取试剂盒(德国赛默飞公司)。

1.2 仪器与设备 气质联用仪(Agilent, 7894A+5975A,色谱柱(Agilent, DB-225MS);超高效液相(ACQUITY Premier, Waters);质谱仪(SCIEX Triple Quad™ 6500+, SCIEX)。

1.3 实验方法

1.3.1 给药剂量的筛选 口服氢溴酸槟榔碱,SD大鼠的 LD_{50} 为2 054 $mg \cdot kg^{-1}$,最大耐受量(LD_0)>10.0 $g \cdot kg^{-1}$ [15-16]。预实验,按照10 $mg \cdot kg^{-1}$ 与50 $mg \cdot kg^{-1}$ 的给药剂量,连续28 d对SD雄性大鼠每天定时1次灌胃处理,结果大鼠体质量、SCFAs含量、肠道微生物组成与对照差异不显著。根据预实验,选用含100、500 $mg \cdot kg^{-1}$ 的氢溴酸槟榔碱的0.9% NaCl溶液,连续3 d对12只SD大鼠灌胃处理,结果100 $mg \cdot kg^{-1}$ 处理在行为上未见异常,500 $mg \cdot kg^{-1}$ 处理大鼠出现活动量增加现象。最终本研究采用的给药剂量为:含100 $mg \cdot kg^{-1}$ Ah与500 $mg \cdot kg^{-1}$ Ah的0.9% NaCl溶液。

1.3.2 动物处理 36只SD雄性大鼠适应性喂养1周后,随机分为3组(每组12只),每天定时灌胃1次,每组分别灌胃含500 $mg \cdot kg^{-1}$ 氢溴酸槟榔碱的0.9% NaCl溶液(500 $mg \cdot kg^{-1}$ Ah组, Ah.500)、100 $mg \cdot kg^{-1}$ 氢溴酸槟榔碱的0.9% NaCl溶液(100 $mg \cdot kg^{-1}$ Ah组, Ah.100)、0 $mg \cdot kg^{-1}$ (对照,CK)氢溴酸槟榔碱的0.9% NaCl溶液(对照组)。给药期间,观察大鼠的日常行为,每7天记录大鼠的取食、饮水与体质量。灌胃28 d后,颈椎脱臼处死。

取SD大鼠结肠内容物与粪便、脑皮质、动脉血经3 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心10 min获得的上清液,置于-80℃保存备用。

1.3.3 SCFAs的检测 参考文献[17]的方法,先将SD大鼠粪便中的SCFAs衍生化,采用气相色谱-质谱法(GC-MS)进行检测。

1.3.4 肠道微生物多样性检测 用Qiagen 51504粪便基因组DNA提取试剂盒,提取SD大鼠结肠内容物中的肠道微生物总DNA,定量、完整性检测后,送至北京诺禾致源科技股份有限公司,进行V3-V4可变区测序,引物序列为341F: ATGCGTACCCGACCTGAGA; 805R: CGTCAGACTTTCGTCCATTGC。基于Illumina NovaSeq250测序平台进行高通量测序,测序结果经过Reads拼接过滤,在97%的序列相似性水平上,对所有序列进行OTUs(Operational Taxonomic Units)聚类,物种注释及丰度分析;并通过诺禾云平台(www.magic.novogene.com)进行 α 多样性(Alpha Diversity)和 β 多样性(Beta Diversity)分析,分析微生物群落结构的差异。

1.3.5 神经递质及其代谢产物的测定 参考文献[18]的方法,采用液相色谱与质谱联用(LC-MS/MS),测定SD大鼠脑皮质、血清中的神经递质的含量。

1.4 数据处理 采用SPSS 26.0统计学软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素ANOVA检验分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 Ah对SD大鼠行为和体质量的影响 给药期间,3组SD大鼠毛光滑有色泽,均未死亡。2个Ah组SD大鼠的每日平均摄食量(图1-A)与饮水量(图1-B)均在第21、28天显著降低($P < 0.01$)。100 $mg \cdot kg^{-1}$ Ah组SD大鼠行为活动无异常,500 $mg \cdot kg^{-1}$ Ah组,在给药后出现兴奋、活动量增加现象。

从图2可知,500 $mg \cdot kg^{-1}$ Ah组SD大鼠在21 d时平均体质量已明显低于对照组($P < 0.05$),在28 d时体质量下降6.95%,出现了负增长,体质量增长率为-0.33%($P < 0.01$)。在21 d时,100 $mg \cdot kg^{-1}$ Ah组SD大鼠平均体质量与对照组无明显差异,在28 d时低于对照,体质量增长率为4.00%,与对照组(CK)差异显著($P < 0.05$)。结果表明,槟榔碱会使

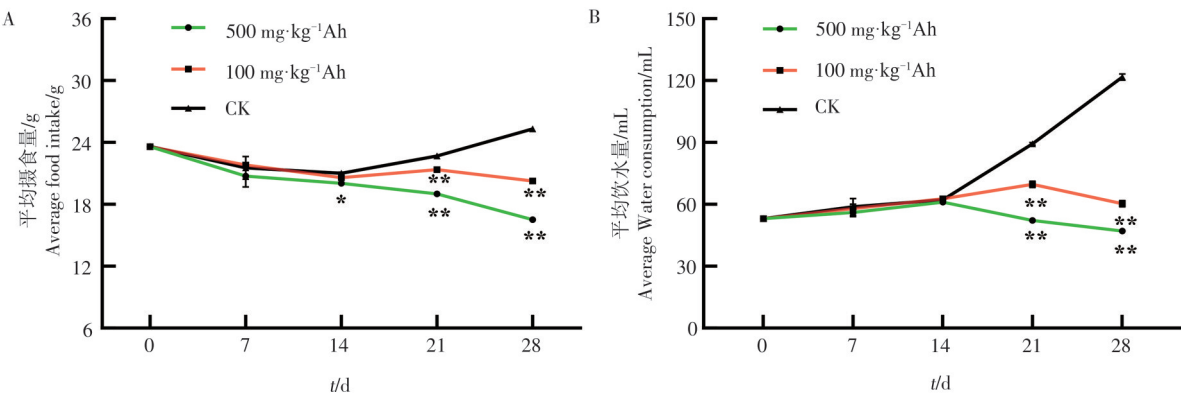


图1 SD大鼠摄食(A)、饮水(B)情况
*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ 。下同。
Fig. 1 Daily intake of food (A) and water (B) of SD rats
*is $P<0.05$, **is $P<0.01$. Similarly hereinafter.

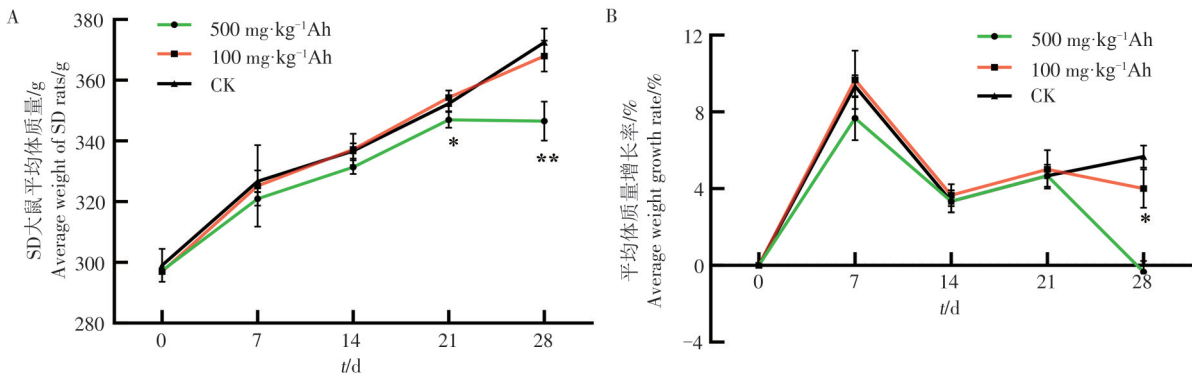


图2 SD大鼠平均体质量(A)与体质量增长率(B)的变化
Fig. 2 Changes in body weight (A) and the rate of weight growth (B) of SD rats

得SD大鼠的摄食与饮水量下降,抑制SD大鼠体质量的生长。

2.2 Ah对SD大鼠粪便中SCFAs含量的影响
2个Ah组的SD大鼠粪便中的乙酸与丙酸含量增加,与对照差异显著($P<0.05$)。500 mg·kg⁻¹ Ah组乙酸、丙酸的含量分别增加8.62%、9.99%,100 mg·kg⁻¹ Ah组乙酸、丙酸的含量分别增加2.82%、16.85%。而丁酸、戊酸与己酸的含量显著降低($P<0.05$),

500 mg·kg⁻¹ Ah组丁酸、戊酸与己酸含量分别下降52.46%、50.76%、97.33%,100 mg·kg⁻¹ Ah组丁酸、戊酸与己酸分别下降26.17%、20.72%、45.81%。5种SCFAs中,己酸含量的变化最大。对照组:乙酸:丙酸:丁酸≈3:1:1(体积比,下同),100 mg·kg⁻¹ Ah组的比例也基本保持在3:1:1,变化不明显;500 mg·kg⁻¹ Ah组乙酸、丙酸、丁酸的比例趋近于6:2:1,比例发生明显改变。

表1 粪便中SCFAs的含量
Tab. 1 Contents of short-chain fatty acids in feces of SD rats $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

处理 Treatments	乙酸 acetic acid	丙酸 propionic acid	丁酸 butyrate acid	戊酸 pentanoic acid	己酸 caproic acid
500 mg·kg ⁻¹ Ah	753.85±6.86 ^a	275.54±6.35 ^a	130.68±4.96 ^c	10.03±1.01 ^c	1.97±0.03 ^c
100 mg·kg ⁻¹ Ah	713.67±5.83 ^b	292.74±2.12 ^a	202.95±9.27 ^b	16.15±0.24 ^b	39.94±1.37 ^b
CK	694.04±10.80 ^b	250.52±5.81 ^b	274.90±2.01 ^a	20.37±0.48 ^a	73.70±0.58 ^a

注:表中不同小写字母表示 $P<0.05$,下同。
Note: Different lowercase letters in the table indicate $P<0.05$, similarly hereinafter.

2.3 Ah对肠道微生物的影响

2.3.1 OTU 聚类 and 样本间的分布 对 3 组 16 SrRNA 扩增子测序所得的原始数据进行分析、拼接,质量控制和嵌合体过滤,最终生成了 136 193 个 read 序列,其中 96.50%(131 420)通过了质控筛选。对所有序列进行 97% 相似水平聚类后得到 831 个 OTUs。3 组的稀疏曲线显示,已识别的 OTUs 数量接近平台期(图 3-A),表明测序深度足以反映各个样本微生物群落的组成和多样性状况。将 3 组肠道微生物测序结果组合在一起绘制 Venn 图(图 3-B), 500 mg·kg⁻¹ Ah 组、100 mg·kg⁻¹ Ah 组、对照组(CK) 3 组的 OTUs 数分别为 311、405、350,特有的 OTUs 数分别为 209、244、203,3 组共有的 OTUs 数是 60,

500 mg·kg⁻¹ Ah 组与对照组共有的 OTUs 数低于 100 mg·kg⁻¹ Ah 组与对照组共有的 OTUs 数。结果表明,在槟榔碱的作用下肠道微生物的组成出现差异。

2.3.2 Alpha 多样性分析 Alpha 多样性结果表明(图 3-E~图 3-H),500 mg·kg⁻¹ Ah 组的 Chao1 指数、Observed 指数、Shannon 指数与 Simpson 指数均低于对照组,表明 500 mg·kg⁻¹ Ah 组肠道微生物丰富度与多样性降低;100 mg·kg⁻¹ Ah 组 Chao1 指数、Observed 指数、Shannon 指数均高于对照组, Simpson 指数略低于对照组。这表明 500 mg·kg⁻¹ 剂量的槟榔碱降低了肠道微生物的丰富度,100 mg·kg⁻¹ 剂量的槟榔碱增加了肠道微生物的丰富度。

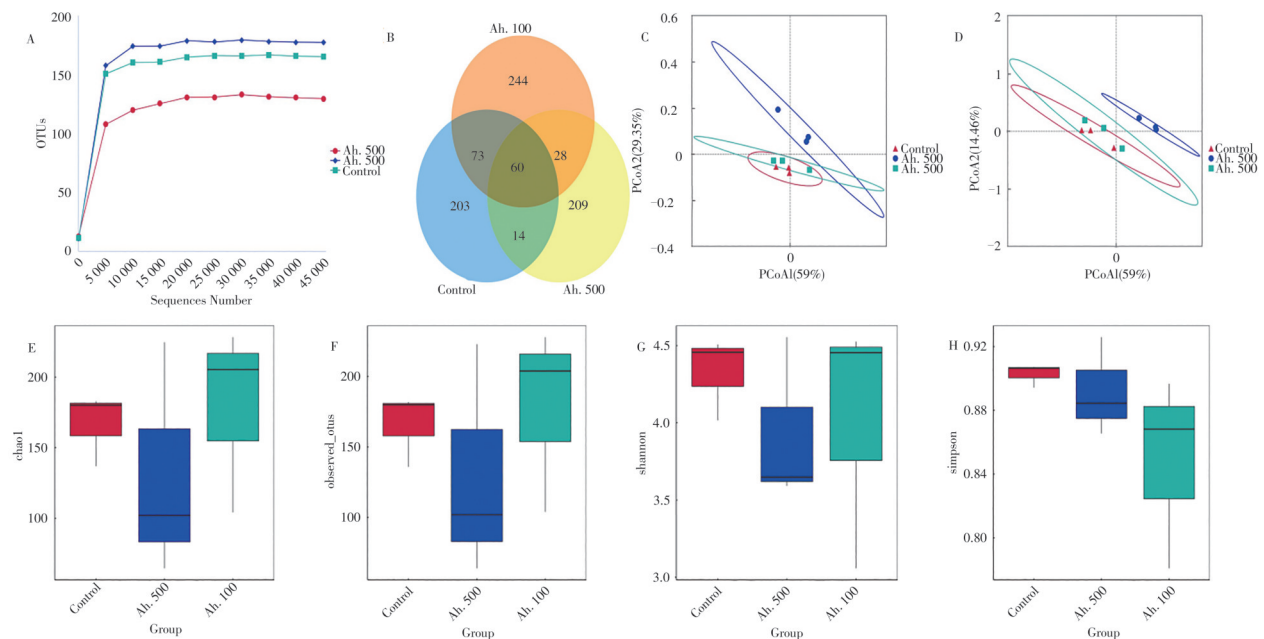


图3 不同分组肠道菌群丰富度与多样性比较

A: 稀疏曲线; B: Venn 图; C: 基于加权 Unifrac 距离的 PCoA 图; D: 基于非加权 Unifrac 距离的 PCoA 图; Alpha 多样性指数: Chao1 (E)、Observed_otus (F)、Shannon (G)、Simpson (H)。图中 Control 即为对照组(CK); Ah. 100 即为 100 mg·kg⁻¹ Ah 组; Ah. 500 即为 500 mg·kg⁻¹ Ah 组, 下同。

Fig. 3 Comparison of intestinal flora richness and diversity in different groups

A: Sparse curve; B: Venn diagram; C: PCoA diagram based on weighted Unifrac distance; D: PCoA diagram based on unweighted Unifrac distance; Alpha diversity index: Chao1 (E), Observed _ otus (F), Shannon (G), Simpson (H). Control in the figure is the control group(CK); Ah. 100 is the 100 mg·kg⁻¹ Ah group; Ah. 500 is 500 mg·kg⁻¹ Ah group, similarly hereinafter.

2.3.3 Beta 多样性分析 基于 Weighted unifrac 距离的 PCoA 分析,第 1 主成分轴贡献率为 59%,第 2 主成分轴贡献率为 29.35%(图 3-C);基于 Unweighted unifrac 距离的 PCoA 分析,第 1 主成分轴贡献率为 28.61%,第 2 主成分轴贡献率为 14.46%(图 3-D)。PCoA 分析结果表明

100 mg·kg⁻¹ Ah 组与对照组距离较近,肠道微生物组成结构相似;500 mg·kg⁻¹ Ah 组与对照组距离较远,肠道微生物组成差异较大,与 α 多样性结果一致。

2.3.4 肠道微生物菌落丰富度分析 物种注释相对丰度柱形图(图 4)表明,在门水平上,

500 mg·kg⁻¹Ah 组与 100 mg·kg⁻¹Ah 组厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidota) 相对丰度增加, 与槟榔碱的剂量呈正相关; 放线菌门 (Actinobacteriota)、变形菌门 (Proteobacteria) 相对丰度降低, 与槟榔碱的剂量呈负相关 (图 4-A)。在属水平上, 500 mg·kg⁻¹Ah 组与 100 mg·kg⁻¹Ah 组乳酸杆

菌属 (*Lactobacillus*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 相对丰度增加, 与槟榔碱的剂量呈正相关; 罗斯氏菌属 (*Rothia*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、无色杆菌属 (*Achromobacter*) 相对丰度降低, 与槟榔碱的剂量呈负相关性 (图 4-B)。

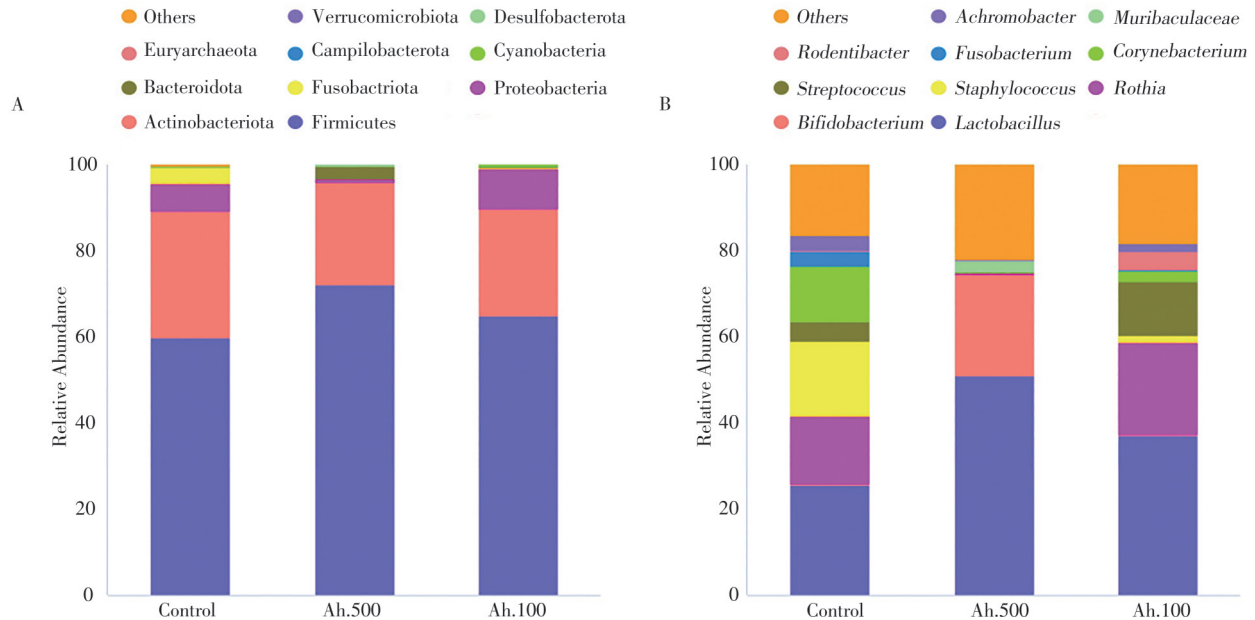


图4 门水平(A)和属水平(B)微生物组成

Fig. 4 Microbial composition at phylum level (A) and genus level (B)

物种聚类热图 (图 5) 显示, 在门水平上, 500 mg·kg⁻¹ Ah 组与 100 mg·kg⁻¹ Ah 组的厚壁菌门 (Firmicutes)、疣微菌门 (Verrucomicrobiota)、脱硫菌门 (Desulfobacterota)、拟杆菌门 (Bacteroidota) 的相对丰度增加, 与槟榔碱的剂量呈正相关; 广古菌门 (Euryarchaeota)、弯曲杆菌门 (Campilobacterota)、梭杆菌门 (Fusobacteriota)、放线菌门 (Actinobacteriota) 的相对丰度降低, 与槟榔碱的剂量呈负相关 (图 5-A)。在属水平上, 500 mg·kg⁻¹ Ah 组与 100 mg·kg⁻¹ Ah 组的乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、*Muribaculaceae* 属、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 的相对丰度增加, 与槟榔碱的剂量呈正相关; 无色杆菌属 (*Achromobacter*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 的相对丰度降低, 与槟榔碱的剂量呈负相关 (图 5-B)。这表明槟榔碱可改变肠道微生物的菌群构成, 增加厚壁菌门、拟杆菌门等优势菌群的相对丰度。

2.4 Ah对SD大鼠神经递质及其代谢产物的影响

2.4.1 SD大鼠脑皮质中神经递质的测定 由表 2 可知, 从 SD 大鼠脑皮质中检测到 14 种神经递质, 500 mg·kg⁻¹ Ah 组脑皮质中有 6 种物质与对照组差异显著 ($P < 0.01$): 乙酰胆碱 (ACh)、犬尿氨酸 (Kyn) 的含量分别下降 29.90%、60.56%, DA、HVA、DOPAC、5-HT 的含量分别增加 1 696.22%、1 064.96%、508.30%、29.40%; 100 mg·kg⁻¹ Ah 组脑皮质中有 5 种物质与对照组差异显著 ($P < 0.01$): ACh、Kyn 的含量分别下降 28.51%、51.61%, DA、HVA、DOPAC 的含量分别增加 829.64%、896.19%、382.36%。2 组给药组中 DA、HVA、DOPAC 的含量均呈多倍增加。结果表明, 槟榔碱影响了 SD 大鼠脑皮质中 DA 的代谢, DA 的含量显著升高, 其代谢产物 HVA、DOPAC 含量也显著增加, 与 DA 有拮抗作用的 ACh 含量则显著降低。

2.4.2 SD大鼠血清中神经递质的含量 从 SD 大鼠血清中检测到 12 种神经递质 (表 3), 未检测到

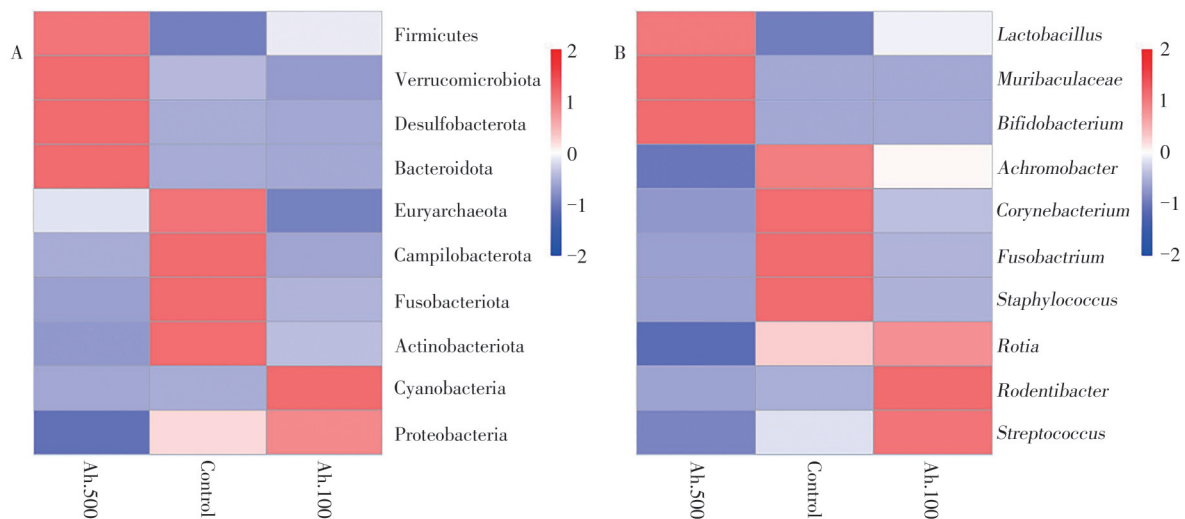


图5 门水平(A)和属水平(B)肠道菌群丰度热图分析

Fig. 5 Heat map analysis of gut flora abundance at phylum level (A) and genus level (B)

表2 SD大鼠脑皮质中神经递质的含量

Tab. 2 Contents of neurotransmitters in the cerebral cortex of SD rats			nmoL·kg ⁻¹
神经递质 Neurotransmitter	500 mg·kg ⁻¹ Ah	100 mg·kg ⁻¹ Ah	CK
谷氨酸 Glutamic acid, Glu	1 026 521.67±45 225.85 ^a	1 156 956.67±19 798.69 ^a	1 174 490.00±60 960.00 ^a
天冬氨酸 Aspartic acid, Asp	546 858.00±28 924.22 ^a	611 425.00±29 608.96 ^a	616 449.00±38 452.12 ^a
γ-氨基丁酸 γ-aminobutyric acid, GABA	240 389.00±15 939.09 ^a	243 501.67±15 573.64 ^a	241 886.00±8 506.21 ^a
甘氨酸 Glycine, Gly	381 481.67±24 048.87 ^a	420 174.00±8 559.72 ^a	429 037.00±4 400.85 ^a
乙酰胆碱 Acetylcholine, ACh	979.14±87.91 ^b	998.55±82.54 ^b	1 396.83±29.69 ^a
色氨酸 Tryptophan, Trp	10 586.97±270.06 ^a	10 925.47±443.19 ^a	11 340.88±898.59 ^a
酪氨酸 Tyrosine, Tyr	26 623.23±2 177.21 ^a	26 237.70±2 473.48 ^a	25 898.27±1 055.25 ^a
犬尿氨酸 Kynurenine, Kyn	61.55±5.57 ^b	75.52±0.79 ^b	156.06±12.58 ^a
去甲肾上腺素 Norepinephrine, NE	841.57±72.46 ^a	778.06±62.88 ^a	698.98±116.97 ^a
多巴胺 Dopamine, DA	223.63±18.73 ^a	115.74±5.78 ^b	12.45±0.49 ^c
高香草酸 Homovanillic acid, HVA	223.09±5.28 ^a	190.77±9.07 ^b	19.15±1.91 ^c
3,4-二羟基苯乙酸 3,4- dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC	216.86±20.12 ^a	171.96±15.94 ^a	35.65±3.98 ^b
5-羟色胺 5-hydroxytryptamine, 5-HT	946.73±13.86 ^a	859.72±55.14 ^{ab}	731.61±18.12 ^b
5-羟基吲哚乙酸 5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA	1 837.52±104.83 ^a	1 782.11±181.98 ^a	1 745.88±165.25 ^a

ACh和DA。与对照组(CK)相比,500 mg·kg⁻¹Ah组血清中有12种物质与对照组差异显著($P<0.01$):Trp、Tyr、Kyn、HVA、DOPAC、5-HT的含量分别下降42.15%、29.00%、73.48%、39.12%、50.34%、45.18%,Glu、Asp、GABA、Gly、NE、5-HIAA的含量分别增加51.44%、164.66%、30.92%、214.10%、1 000%、77.33%。100 mg·kg⁻¹Ah组血清中有5种物质与对照组差异显著($P<0.01$):Kyn、HVA、DOPAC的含量分别下降

56.32%、43.28%、55.93%;Gly、NE的含量分别增加50.54%、256.42%。Asp、Gly、NE 3种物质的含量变化最为显著。结合2.4.1 SD大鼠脑皮质中神经递质及其代谢产物结果,槟榔碱可能促进血液中的HVA、DOPAC、5-HT穿过血脑屏障进入脑组织,导致血清中此3种物质的含量降低。Trp、Tyr、5-HT的含量变化与槟榔碱的剂量呈负相关,Asp、GABA、5-HIAA的含量变化与槟榔碱的剂量呈正相关。

表3 SD大鼠血清中神经递质的含量
Tab. 3 Contents of neurotransmitters in the serum of SD rats nmoL·L⁻¹

神经递质 Neurotransmitter	500 mg·kg ⁻¹ Ah	100 mg·kg ⁻¹ Ah	CK
谷氨酸 Glutamic acid, Glu	28 948.57±4 755.45 ^a	18 893.23±439.11 ^b	19 114.83±975.40 ^b
天冬氨酸 Aspartic acid, Asp	12 594.91±712.50 ^a	4 799.98±432.68 ^b	4 758.81±375.74 ^b
γ-氨基丁酸 γ-aminobutyric acid, GABA	106.62±6.45 ^a	76.76±3.47 ^b	81.44±1.91 ^b
甘氨酸 Glycine, Gly	248 849.70±13 448.54 ^a	119 266.33±8 589.30 ^b	79 226.67±3 857.49 ^c
乙酰胆碱 Acetylcholine, ACh	—	—	—
色氨酸 Tryptophan, Trp	27 075.07±1 665.46 ^b	37 207.40±5 437.32 ^{ab}	46 799.83±4 068.44 ^a
酪氨酸 Tyrosine, Tyr	16 783.43±800.99 ^b	21 308.90±1 161.12 ^a	23 637.83±136.97 ^a
犬尿氨酸 Kynurenine, Kyn	347.90±21.61 ^c	572.99±33.58 ^b	1 311.71±60.75 ^a
去甲肾上腺素 Norepinephrine, NE	168.63±27.05 ^a	54.64±1.08 ^b	15.33±1.14 ^c
多巴胺 Dopamine, DA	—	—	—
高香草酸 Homovanillic acid, HVA	21.35±0.65 ^b	19.89±0.81 ^b	35.07±0.96 ^a
3,4-二羟基苯乙酸 3,4- dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC	10.93±0.98 ^b	9.70±1.41 ^b	22.01±3.62 ^a
6-羟色胺 5-hydroxytryptamine, 5-HT	8 098.48±1 701.16 ^b	12 988.93±522.83 ^{ab}	14 771.67±1 875.61 ^a
6-羟基吲哚乙酸 5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA	267.10±35.96 ^a	133.02±11.96 ^b	150.62±12.86 ^b

3 讨 论

吴忠坤^[19]用鲜槟榔的1倍、5倍水提取灌胃4周龄的雄性昆明小鼠4周,发现肠道中的拟杆菌

的数量增加。ZHOU等^[20]将含5%~20%的槟榔粉茯苓茶的水提物灌胃雄性KM小鼠28 d后,发现粪便中厚壁菌门、拟杆菌门相对丰度增加,增加了乙酸、丙酸的产生。乙酸、丙酸可刺激肠道运动,促

进肠道蠕动与消化^[21-23],肠道中的放线菌门罗斯氏菌属相对丰度降低,粪便中丁酸、戊酸、己酸含量减少^[24]。本研究结果与以上结果相似,笔者发现,2个Ah组肠道中的厚壁菌门与拟杆菌门的相对丰度提高,粪便中乙酸、丙酸含量上升。罗斯氏菌属(*Rothia*)等相对丰度降低,粪便中丁酸、戊酸、己酸含量减少。

5-羟色胺(5-HT)是兴奋性神经递质,绝大部分在胃肠道中分泌合成,调控肠蠕动,部分5-HT基于MGBA进入大脑参与神经调控,5-HT能影响下丘脑渗透压感受器来调节饮水、参与饱食信号的传递控制食欲^[25]。Trp是哺乳动物蛋白质合成的必需氨基酸,其可通过3种途径代谢,分别形成5-HT、Kyn与5-HIAA。本研究发现2个Ah组脑皮质中5-HT含量都上升,可能在槟榔碱作用下,肠道中的5-HT通过MGBA进入大脑,脑皮质中Trp主要代谢形成的产物也是5-HT,来调节降低SD大鼠的食欲。表现出SD大鼠在21 d时取食、饮水下降、导致28 d时体质量下降。

槟榔碱可通过刺激下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴,激活垂体分泌肾上腺皮质激素,发挥兴奋作用^[26-27]。长期大量食用槟榔碱导致行为上的震颤症状,认为是槟榔碱导致的ACh功能亢进有关^[28]。DA与ACh存在拮抗作用,DA的增加能抑制ACh的释放^[29]。本研究发现,2个Ah组脑皮质层肾上腺激素的前体物质DA含量显著上升,DA的主要代谢产物DOPAC与HVA的含量也显著上升,且500 mg·kg⁻¹ Ah组显著高于100 mg·kg⁻¹ Ah组与对照组。2个Ah组脑皮质层ACh含量显著降低,而DA含量显著上升。本研究中,500 mg·kg⁻¹ Ah组SD大鼠出现兴奋、躁动等行为可能与DA及其代谢产物增加,或者与DA和ACh的失衡有关。

GABA是神经抑制作用的神经递质^[14],通过结合突触后膜的GABA受体抑制神经冲动的传递。槟榔碱可以选择性地与GABA受体结合,抑制机体对GABA的摄取^[2, 30]。这个结果与500 mg·kg⁻¹ Ah组SD大鼠给药后出现活动量增加等现象有关。

肠道与大脑通过MGBA进行双向沟通,肠道SCAFS的改变可导致神经递质含量变化^[1]。LI等^[31]发现,双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)和鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)使Wistar大鼠结肠中5-HT含量降低,额叶皮质和海马中5-HT含量升高,

其抑郁症状得到改善。TIAN等^[32]发现,双歧杆菌菌株CCFM687促使色氨酸羟化酶(Tph1)基因表达上调,海马和额叶皮质中5-HT含量升高。本研究中,肠道中乙酸、丙酸的含量增加,使脑皮质中神经递质DA、5-HT的含量增加,SD大鼠活动量增加。

本研究结果表明,槟榔碱通过提高SD大鼠肠道内乳酸杆菌属、双歧杆菌属等的相对丰度,增加肠道内乙酸、丙酸等的含量,促进肠道蠕动,并促进脑皮质中兴奋神经递质DA、5-HT等含量的增加、降低了抑制作用神经递质GABA的含量,槟榔碱可以通过微生物-肠-脑调控SD大鼠的生理和行为的改变,使SD大鼠出现好动、食欲下降、体质量降低等现象。本试验模型解释了人类嗜嚼槟榔后身体出现消瘦、冒汗、提神、愉悦等表征的机制。本研究还阐明了槟榔碱对SD大鼠“微生物-肠-脑”轴的调节机制,可为槟榔食用安全评价及临床用药提供参考依据。

参考文献:

- [1] 汪怡婷, 郑凯旋, 李茂全. 微生物-肠-脑轴在阿尔茨海默病中的相关研究进展 [J]. 中国医药科学, 2023, 13(21): 45-48.
- [2] CUMMINGS J H, POMARE E W, BRANCH W J, et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood [J]. Gut, 1987, 28(10): 1221-1227.
- [3] GLOWACKI R W P, MARTENS E C. In sickness and health: effects of gut microbial metabolites on human physiology [J]. PLoS Pathogens, 2020, 16(4): e1008370.
- [4] HOLD G L, HANSEN R. Impact of the gastrointestinal microbiome in health and disease: co-evolution with the host immune system [M]//Backert S. Molecular Mechanisms of Inflammation: Induction, Resolution and Escape by *Helicobacter pylori*. Cham: Springer, 2019: 303-318.
- [5] SAVKOVIC S D. Gut microbes effects on host metabolic alterations in health and disease [J]. Gut Microbes, 2020, 11(3): 249-252.
- [6] WANG L, WANG S, ZHANG Q, et al. The role of the gut microbiota in health and cardiovascular diseases [J]. Molecular Biomedicine, 2022, 3(1): 30.
- [7] YAO Y, CAI X, FEI W, et al. The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(1): 1-12.
- [8] XIONG T W, LIU B, WU Q, et al. Beneficial effects of

- Dendrobium nobile* Lindl. Alkaloids (DNLA) on anxiety and depression induced by chronic unpredictable stress in rats [J]. *Brain Research*, 2021, 1771: 147647.
- [9] 罗鑫, 张骏, 徐祖才. 神经系统疾病中兴奋性氨基酸作用的研究进展 [J]. *癫痫与神经电生理学杂志*, 2015, 24(5): 307–310.
- [10] 裴丽娟, 冯晨晨, 姚超, 等. 电针对正常小鼠血清单胺类神经递质的影响 [J]. *上海针灸杂志*, 2023, 42(11): 1215–1222.
- [11] 孙佳磊, 朱仁德, 吴静, 等. 新型AChE抑制剂胡椒碱衍生物对阿尔茨海默病小鼠的治疗作用评价 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(11): 2064–2069.
- [12] RUDDICK J P, EVANS A K, NUTT D J, et al. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications [J]. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2006, 8(20): 1–27.
- [13] OLIVEIRA N G, RAMOS D L, DINIS-OLIVEIRA R J. Genetic toxicology and toxicokinetics of arecoline and related areca nut compounds: an updated review [J]. *Archives of Toxicology*, 2021, 95(2): 375–393.
- [14] 张晶, 代佳慧, 代文婷, 等. 槟榔生物碱致癌性、致口腔黏膜下纤维化及兴奋作用等活性研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(18): 356–364.
- [15] 周绪正, 张继瑜, 李金善, 等. 大鼠及小鼠口服氢溴酸槟榔碱片剂的急性毒性试验[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2012(21): 114–115.
- [16] 周绪正, 张继瑜, 赵成莹, 等. 小鼠和大鼠口服氢溴酸槟榔碱的急性毒性试验[J]. *动物医学进展*, 2007, 28(9): 34–36.
- [17] HE L, PRODHAN M A I, YUAN F, et al. Simultaneous quantification of straight-chain and branched-chain short chain fatty acids by gas chromatography mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2018, 1092: 359–367.
- [18] SUN L, CHEN Y, HOU C, et al. Neuroprotective effect of total glycosides from paeonies against neurotoxicity induced by strychnos alkaloids related to recovering the levels of neurotransmitters and neuroendocrine hormones in rat serum and brain [J]. *RSC Advances*, 2018, 8(51): 29210–29219.
- [19] 吴忠坤. 鲜槟榔及不同添加物对小鼠生长、免疫与肠道微生物的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
- [20] ZHOU M X, TIAN X, WU Z Q, et al. Fuzhuan brick tea supplemented with areca nuts: effects on serum and gut microbiota in mice [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(5): e13737.
- [21] 黎旭, 黄志钰, 黄娟, 等. 乳双歧杆菌Y6活菌型发酵乳对消化功能障碍人群肠道健康的影响[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(1): 170–177.
- [22] 杨兴杰, 刘莉, 高立香, 等. 双歧杆菌抗结直肠癌细胞活性的机制[J]. *生物技术*, 2023, 33(5): 610–615.
- [23] ZHONG X, ZHAO Y, HUANG L, et al. Remodeling of the gut microbiome by *Lactobacillus johnsonii* alleviates the development of acute myocardial infarction [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1140498.
- [24] SALEM F, KINDT N, MARCHESI J R, et al. Gut microbiome in chronic rheumatic and inflammatory bowel diseases: similarities and differences [J]. *United European Gastroenterology Journal*, 2019, 7(8): 1008–1032.
- [25] JONES L A, SUN E W, MARTIN A M, et al. The ever-changing roles of serotonin [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2020, 125: 105776.
- [26] 易书瀚, 李珂, 杨靖, 等. 槟榔提取物的生物活性研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(7): 207–212.
- [27] 尹明松, 潘飞兵, 郭建行, 等. 槟榔化学成分及生物活性研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(15): 219–224.
- [28] 王炳, 方晓雨, 高峰, 等. 五味子酚对槟榔碱致帕金森病模型小鼠的保护作用[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2017, 38(16): 1861–1863.
- [29] 孙悦, 李敏, 李玉川, 等. 纹状体胆碱能神经元功能失调与帕金森病[J]. *生理科学进展*, 2022, 53(3): 185–189.
- [30] 刘东林, 王小莹, 杨冰, 等. 槟榔药理毒理研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(14): 2273–2275.
- [31] LI H, WANG P, HUANG L, et al. Effects of regulating gut microbiota on the serotonin metabolism in the chronic unpredictable mild stress rat model [J]. *Neuro-gastroenterology and Motility*, 2019, 31(10): e13677.
- [32] TIAN P, ZOU R, SONG L, et al. Ingestion of *Bifidobacterium longum* subspecies infantis strain CCFM687 regulated emotional behavior and the central BDNF pathway in chronic stress - induced depressive mice through reshaping the gut microbiota [J]. *Food & Function*, 2019, 10(11): 7588–7598.

Effects of arecoline on gut microbiota composition and neurotransmitters contents in SD rats

WANG Aoxue, ZHAO Chao

(School of Pharmaceutical Sciences / Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Biological Resources, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: An attempt was made to understand the effects of arecoline on gut microbiota composition and neurotransmitters contents in SD rats based on the microbiota-gut-brain axis. Three groups of SD rats were administered with arecoline hydrobromide (Ah) solution dissolved in 0.9% NaCl aqueous solution by gavage for 28 days, and the ratios of weight of Ah/ rat were 500, 100 and 0 (control group) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ after administration. Then the composition of intestinal microbes in colon, the contents of short-chain fatty acids in feces and the contents of neurotransmitters in the cerebral cortex and serum were determined and analyzed. The results showed that the Ah, when administered to SD rats, increased relative abundance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, and the contents of acetic acid and propionic acid in the gut, and the contents of excitatory neurotransmitters like DA and 5-HT in the cerebral cortex, and reduced the content of GABA which is inhibitory neurotransmitters. These results indicate that arecolineAh regulates the physiological metabolism and behavior of SD rats through microbiota-gut-brain axis, leading to symptoms such as hyperactivity, loss of appetite, and weight loss in SD rats.

Keywords: arecoline; gut microbe; neurotransmitter; microbiota-gut-brain axis

(责任编辑:潘学峰)