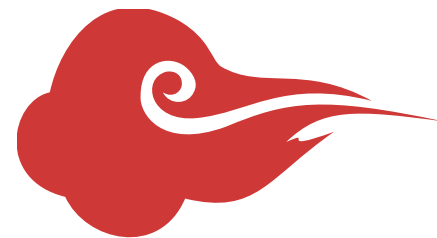
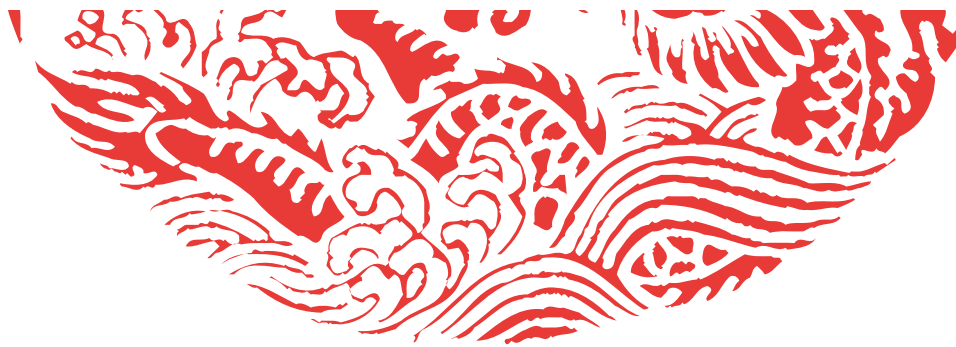




# 赵一夫读书报告

## 2019.12.15



PRESENTED BY 赵一夫



IF=17.848



ARTICLE OPEN

# Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression

Xinyi Wang<sup>1</sup>, Guangqiang Sun<sup>1</sup>, Teng Feng<sup>1</sup>, Jing Zhang<sup>1</sup>, Xun Huang<sup>2</sup>, Tao Wang<sup>3</sup>, Zuoquan Xie<sup>2</sup>, Xingkun Chu<sup>1</sup>, Jun Yang<sup>1</sup>, Huan Wang<sup>2</sup>, Shuaishuai Chang<sup>1</sup>, Yanxue Gong<sup>1</sup>, Lingfei Ruan<sup>1</sup>, Guanqun Zhang<sup>1</sup>, Siyuan Yan<sup>1</sup>, Wen Lian<sup>1</sup>, Chen Du<sup>1</sup>, Dabing Yang<sup>1</sup>, Qingli Zhang<sup>4</sup>, Feifei Lin<sup>4</sup>, Jia Liu<sup>4</sup>, Haiyan Zhang<sup>2</sup>, Changrong Ge<sup>1</sup>, Shifu Xiao<sup>3</sup>, Jian Ding<sup>2</sup> and Meiyu Geng<sup>2</sup>

Recently, increasing evidence has suggested the association between gut dysbiosis and Alzheimer's disease (AD) progression, yet the role of gut microbiota in AD pathogenesis remains obscure. Herein, we provide a potential mechanistic link between gut microbiota dysbiosis and neuroinflammation in AD progression. Using AD mouse models, we discovered that, during AD progression, the alteration of gut microbiota composition leads to the peripheral accumulation of phenylalanine and isoleucine, which stimulates the differentiation and proliferation of pro-inflammatory T helper 1 (Th1) cells. The brain-infiltrated peripheral Th1 immune cells are associated with the M1 microglia activation, contributing to AD-associated neuroinflammation. Importantly, the elevation of phenylalanine and isoleucine concentrations and the increase of Th1 cell frequency in the blood were also observed in two small independent cohorts of patients with mild cognitive impairment (MCI) due to AD. Furthermore, GV-971, a sodium oligomannate that has demonstrated solid and consistent cognition improvement in a phase 3 clinical trial in China, suppresses gut dysbiosis and the associated phenylalanine/isoleucine accumulation, harnesses neuroinflammation and reverses the cognition impairment. Together, our findings highlight the role of gut dysbiosis-promoted neuroinflammation in AD progression and suggest a novel strategy for AD therapy by remodelling the gut microbiota.


# 研究背景





## 研究背景



- 阿尔茨海默病 (Alzheimer' s disease, AD) 又称老年痴呆, 是一种神经退行性疾病。近年来, 大量研究表明肠道菌群与宿主先天和适应性免疫系统之间存在动态相互作用。肠道菌群失调可危害宿主免疫反应, 促进各种炎症性疾病的发展, 其中也包括AD相关的炎症。来自动物和人类研究的新证据表明, 肠道菌群失调与AD发展过程中小胶质细胞活化之间存在联系。肠道菌群可能参与调节AD中的小胶质细胞活化和神经炎症。除了激活小胶质细胞外, CD4+、CD8+ T细胞等外周免疫细胞浸润在AD相关神经炎症中的作用越来越受到重视。但目前仍不清楚哪种类型的浸润免疫细胞在功能上参与AD的进展。
- 

## 甘露特钠胶囊

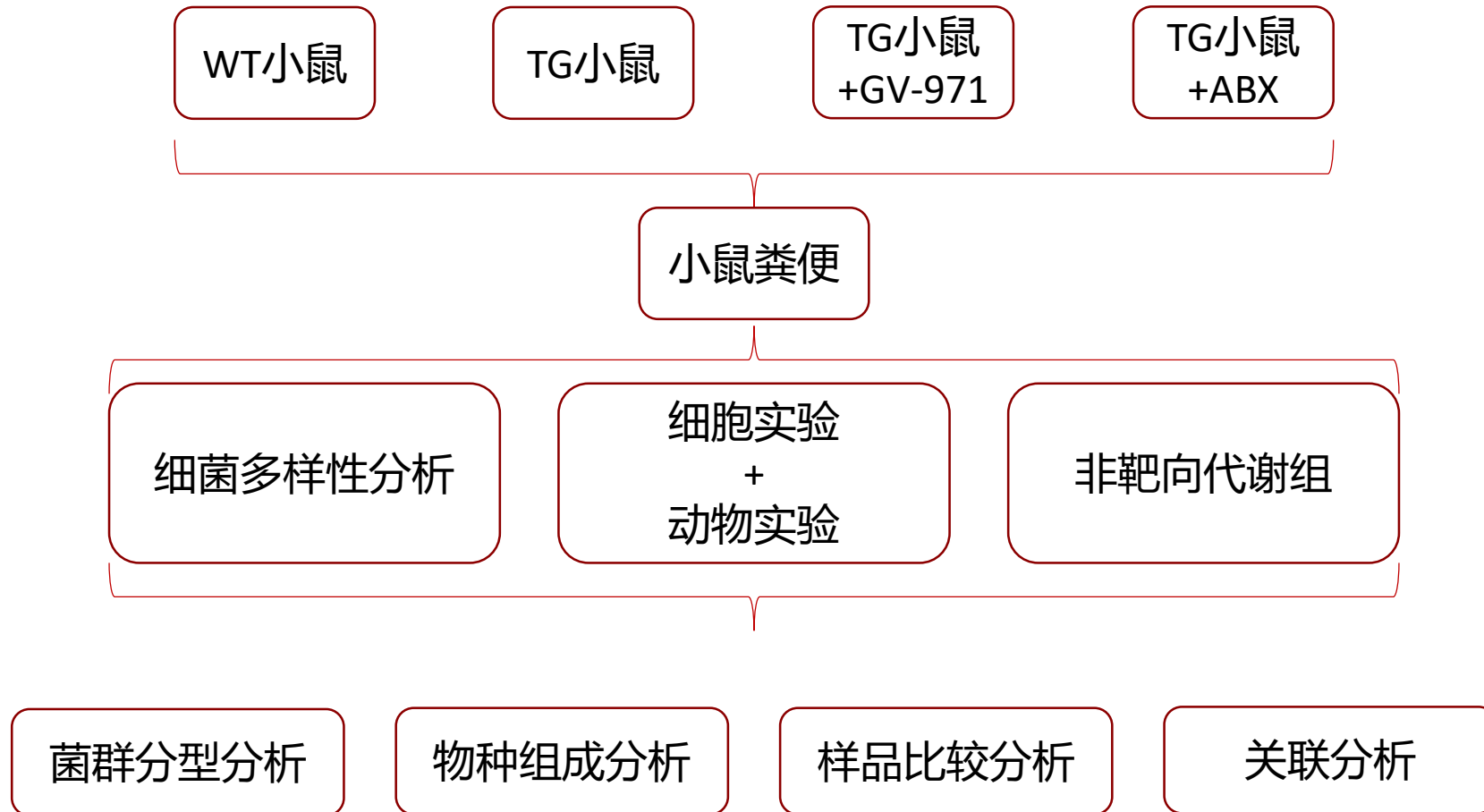
- 甘露特钠胶囊（Oligomannate, GV-971, 商品名“九期一”）是我国自主研发并拥有自主知识产权的创新药，它的上市将填补该领域全球17年无新药的空白；
- GV-971是一种新型的海洋低聚糖，从海藻中提取，具备多种靶向机制。中国科学院称，不同于传统靶向抗体药物，它能够多位点、多片段、多状态地捕获 $\beta$ 淀粉样蛋白（A $\beta$ ），抑制A $\beta$ 纤丝形成，使已形成的纤丝解聚为无毒单体。



# 材料与amp;方法



# 技术路线



# 实验方法

## 小鼠处理

将TG小鼠分别在2、3、5、7和9个月大时收集粪便及处死取其大脑；  
使用GV-971治疗小鼠，在7个月大时，对其进行100 mg/kg每日一次的灌胃，为期一个月。

## 行为检测

辨别学习。5XFAD小鼠和WT小鼠在不同月份以及治疗后分别接受了认知壁辨别空间学习任务的测试。7只老鼠在试验前一周习惯于单独的笼子。在适应阶段，老鼠可以自由取水，但食物有限。在实验过程中，小鼠需要学习从左侧入口进入认知墙(提供三个入口)获取食物(从左侧入口每五所有的小鼠运动都由计算机跟踪系统记录。达到80%正确率的时间越长，说明辨别能力越差。



# 实验方法

## 肠道内容物高通量测序

使用E.Z.N.A.® Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, U.S.)提取DNA ;  
引物338 F (5'-ACTCCTACGGGAGGCGAGCAG-3')与806 R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')

## LC/MS分析参数

LC条件:

柱: Acquity BEH C18 column (100 mm ×2.1 mm i.d., 1.7 μm; Waters, Milford, USA);

溶剂: 柱保持为40 °C ;

分离梯度: 5% B-30% B 大于 0-3 min, 30% B-95% B 大于 3-9 min, 95% B-95% B 大于 9-13.0 min; 95% B-5% B 大于 13.0-13.1min, 5 % B 保持13.1-16 min, 流速为0.40 mL/min, B为乙腈与异丙醇1:1混合液 (0.1% (v/v)) A 为甲酸溶液 (0.1% (v/v))。

# 实验方法

## 同窝饲养，粪菌移植

WT小鼠与Tg小鼠共同饲养在一个笼子里；  
将Tg小鼠粪菌移植到正常小鼠。相反，将正常小鼠粪菌移植到Tg小鼠。

## 水迷宫与Y迷宫

让AD模型小鼠在接受GV-971治疗前进行迷宫测试，对比治疗3个月后进行迷宫测试的结果。

Type	Sample ID	Age	Gender
Healthy	HC-01	75	F
Healthy	HC-02	71	F
Healthy	HC-04	69	F
Healthy	HC-05	73	F
Healthy	HC-08	63	M
Healthy	HC-09	62	M
Healthy	HC-10	68	M
Healthy	HC-11	61	M
Healthy	HC-12	68	M
Healthy	HC-13	75	F
Healthy	HC-14	70	F
Healthy	HC-15	68	M
Healthy	HC-16	62	M
Healthy	HC-17	75	M
Healthy	HC-18	65	F
Healthy	HC-19	64	F
Healthy	HC-20	64	F
Healthy	HC-22	63	F
MCI due to AD	MCI-02	61	F
MCI due to AD	MCI-03	79	M
MCI due to AD	MCI-04	71	F
MCI due to AD	MCI-05	72	F
MCI due to AD	MCI-06	80	F
MCI due to AD	MCI-07	65	M
MCI due to AD	MCI-09	61	M
MCI due to AD	MCI-10	69	M
MCI due to AD	MCI-14	77	M

## 人体第三阶段验证

标准：

第一、关注认知障碍；

第二、一个或多个认知领域的损伤；

第三、在功能上保持独立性；

第四、非痴呆。

第一组由9名AD患者与18名健康受试者组成

# 人体第三阶段验证



第二组由22名AD患者与22名健康受试者组成

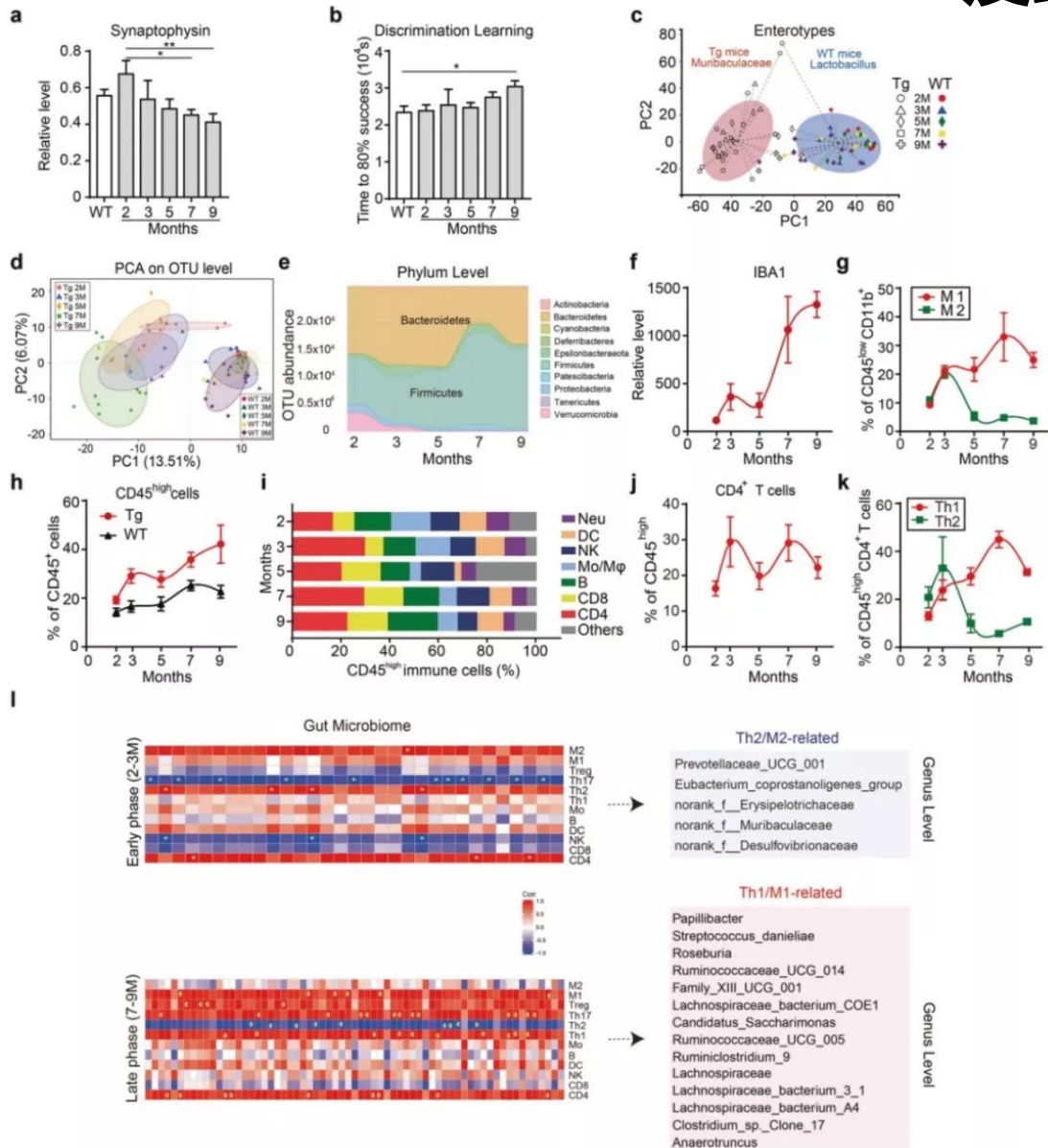
Category	Sample ID	Age	Gender
Healthy	HC-0149	73	M
Healthy	HC-0150	70	F
Healthy	HC-0153	63	F
Healthy	HC-0156	67	M
Healthy	HC-0158	71	F
Healthy	HC-0165	61	F
Healthy	HC-0168	62	F
Healthy	HC-0172	70	F
Healthy	HC-0176	71	F
Healthy	HC-0187	73	F
Healthy	HC-0191	65	M
Healthy	HC-0013	70	F
Healthy	HC-0043	81	M
Healthy	HC-0050	64	F
Healthy	HC-0051	66	M
Healthy	HC-0056	75	M
Healthy	HC-0068	67	F
Healthy	HC-0074	57	F
Healthy	HC-0076	60	F
Healthy	HC-0081	71	F
Healthy	HC-0089	57	F
Healthy	HC-0090	76	F
MCI due to AD	MCI-0169	65	F
MCI due to AD	MCI-0175	61	F
MCI due to AD	MCI-0211	69	M
MCI due to AD	MCI-0229	65	M
MCI due to AD	MCI-0240	59	F
MCI due to AD	MCI-0244	64	F

Category	Sample ID	Age	Gender
MCI due to AD	MCI-0257	61	F
MCI due to AD	MCI-0260	60	F
MCI due to AD	MCI-0282	66	F
MCI due to AD	MCI-0284	64	F
MCI due to AD	MCI-0287	75	F
MCI due to AD	MCI-0303	62	F
MCI due to AD	MCI-0319	63	F
MCI due to AD	MCI-0332	67	F
MCI due to AD	MCI-0374	61	M
MCI due to AD	MCI-0385	68	F
MCI due to AD	MCI-0401	57	F
MCI due to AD	MCI-0414	64	F
MCI due to AD	MCI-0001	75	M
MCI due to AD	MCI-0043	55	F
MCI due to AD	MCI-0061	63	F
MCI due to AD	MCI-0091	78	F

# 实验结果



# AD的进展与肠道菌群和免疫细胞浸润的改变有关

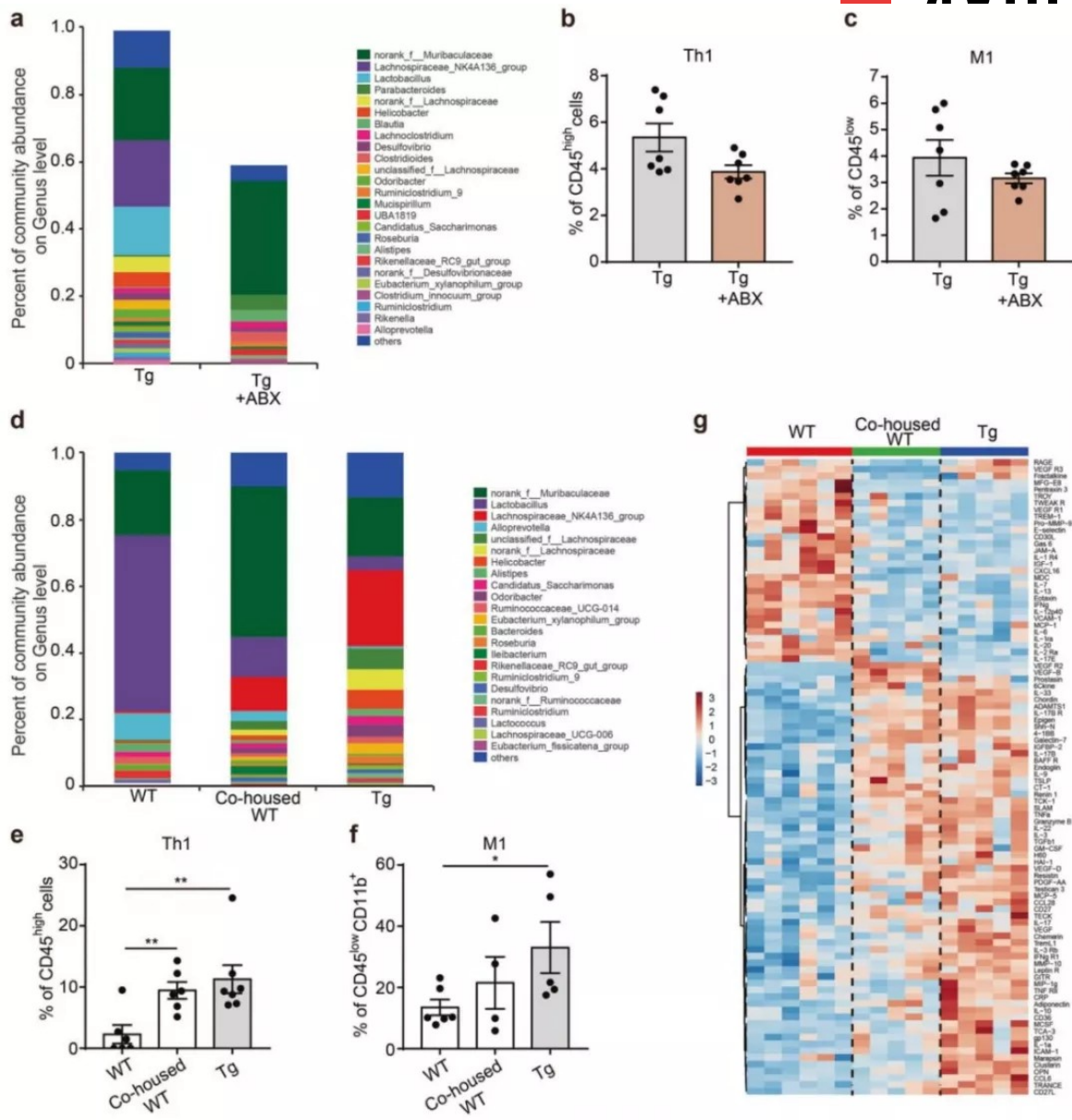


为了研究肠道菌群改变与AD发病之间的关系，作者使用了常用的5XFAD转基因 (Tg) 小鼠模型。研究发现，7-9月龄小鼠的海马体突触素表达水平明显下降，提示突触变性，同时9月龄小鼠的辨别学习能力显著下降。

对肠道菌群的分型分析发现，Tg小鼠和野生型 (WT) 小鼠的肠道菌群呈现不同的类型。随着AD病程的进展，Tg小鼠的肠道菌群组成发生了显著改变。在第2个月时，拟杆菌门、厚壁菌门和疣微菌门丰度最高 (Bacteroides 47.3%、Firmicutes 33.0% 和 Verrucomicrobia 12.2%)，到第7个月时，厚壁菌门成为优势菌 (62.8%)。

另外，肠道菌群可能参与引发大脑神经炎症。研究发现，Tg小鼠脑内小胶质细胞呈现激活状态，同时外周免疫细胞浸润状态发生改变。相关性分析进一步显示，AD发展早期和晚期的肠道菌群与脑免疫细胞之间具有显著相关性。以上结果表明，在AD发展过程中，肠道菌群变化与脑内免疫细胞以及神经炎症密切相关。

# 肠道菌群是大脑免疫细胞浸润和小胶质细胞活化所必需

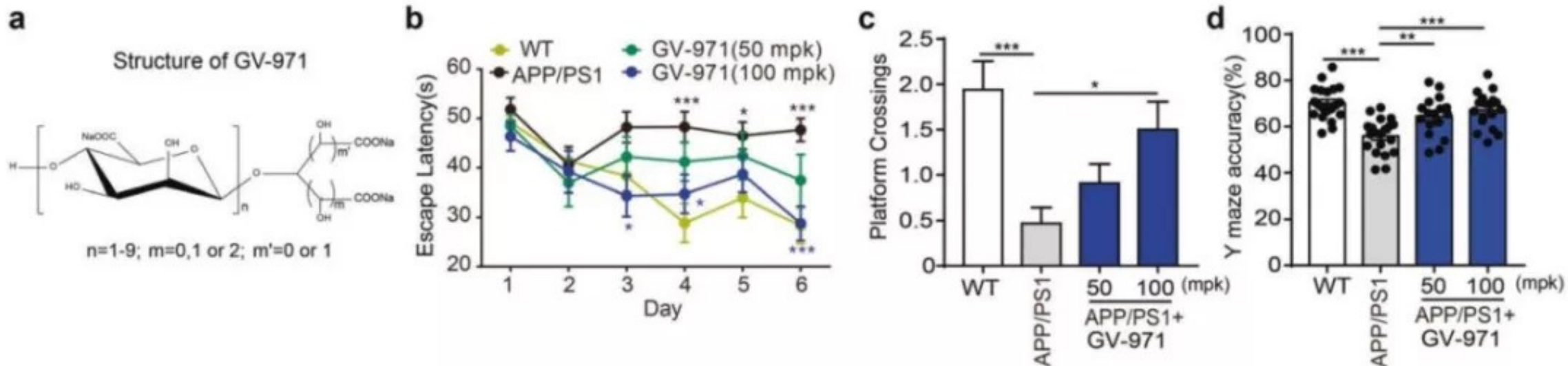


抗生素处理Tg小鼠后，其肠道菌群丰度显著降低，同时脑中浸润的Th1免疫细胞的比例和M1小胶质细胞的活化也明显降低。同窝饲养实验进一步证实了这一发现，同窝饲养的WT小鼠与Tg小鼠肠道菌群组成十分相似，但与单独饲养的同龄WT小鼠肠道菌群组成存在显著差异。而同窝饲养的WT小鼠的脑中Th1、M1细胞的比例显著升高，细胞因子的表达谱也更接近于Tg小鼠。

粪菌移植实验证实了该结果，正常小鼠接受Tg小鼠粪菌后脑中Th1细胞比例明显增加。反之，Tg小鼠接受正常小鼠粪菌后，脑中Th1细胞比例明显减少。

这些结果表明，在AD发展过程中，肠道菌群改变可以驱动外周免疫细胞浸润以及神经炎症反应。

# GV-971对认知障碍有改善作用



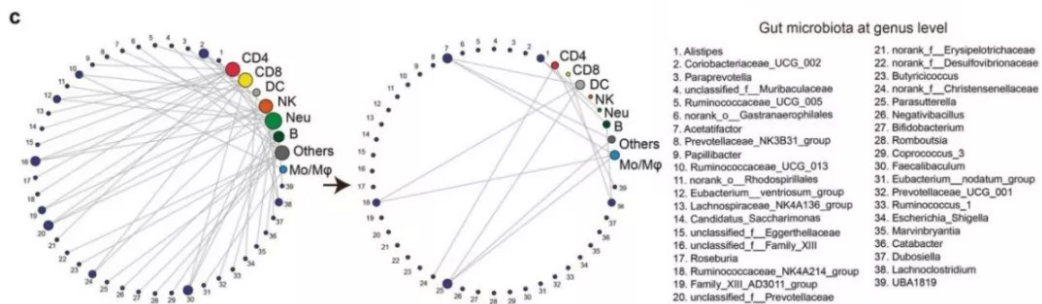
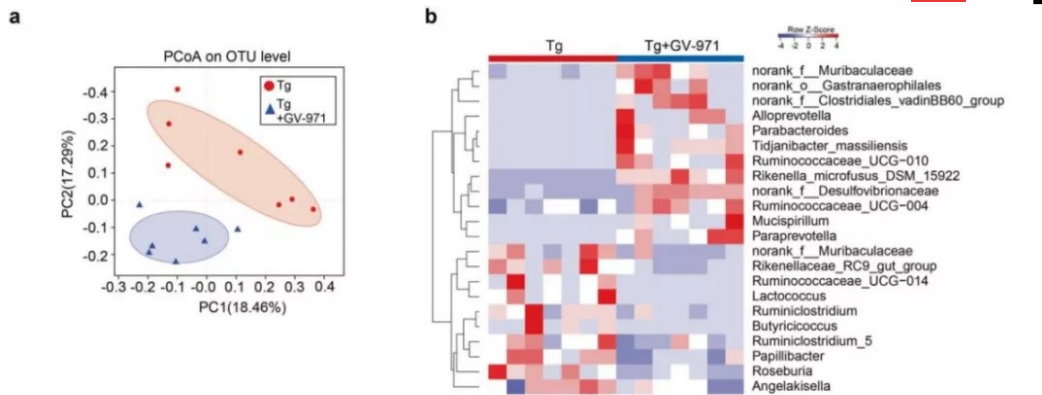
作者验证了其团队研发的抗AD寡糖类新药GV-971对AD转基因小鼠认知功能障碍的改善作用。水迷宫和Y迷宫实验结果表明，AD模型小鼠接受GV-971治疗3个月后，空间学习和记忆能力明显增强。同时，在最近结束的为期36周的多中心、随机、双盲的III期临床试验中，GV-971能够明显改善AD患者的认知功能障碍。

由于单糖或寡糖等碳水化合物是细菌的主要营养来源，对细菌具有多种调节作用，GV-971可能会影响肠道菌群，而肠道菌群在AD进展中的重要作用提示可以通过干预肠道菌群来治疗AD。

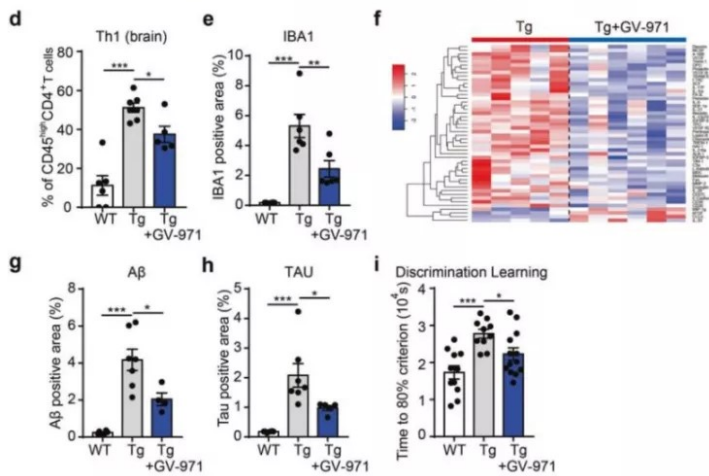




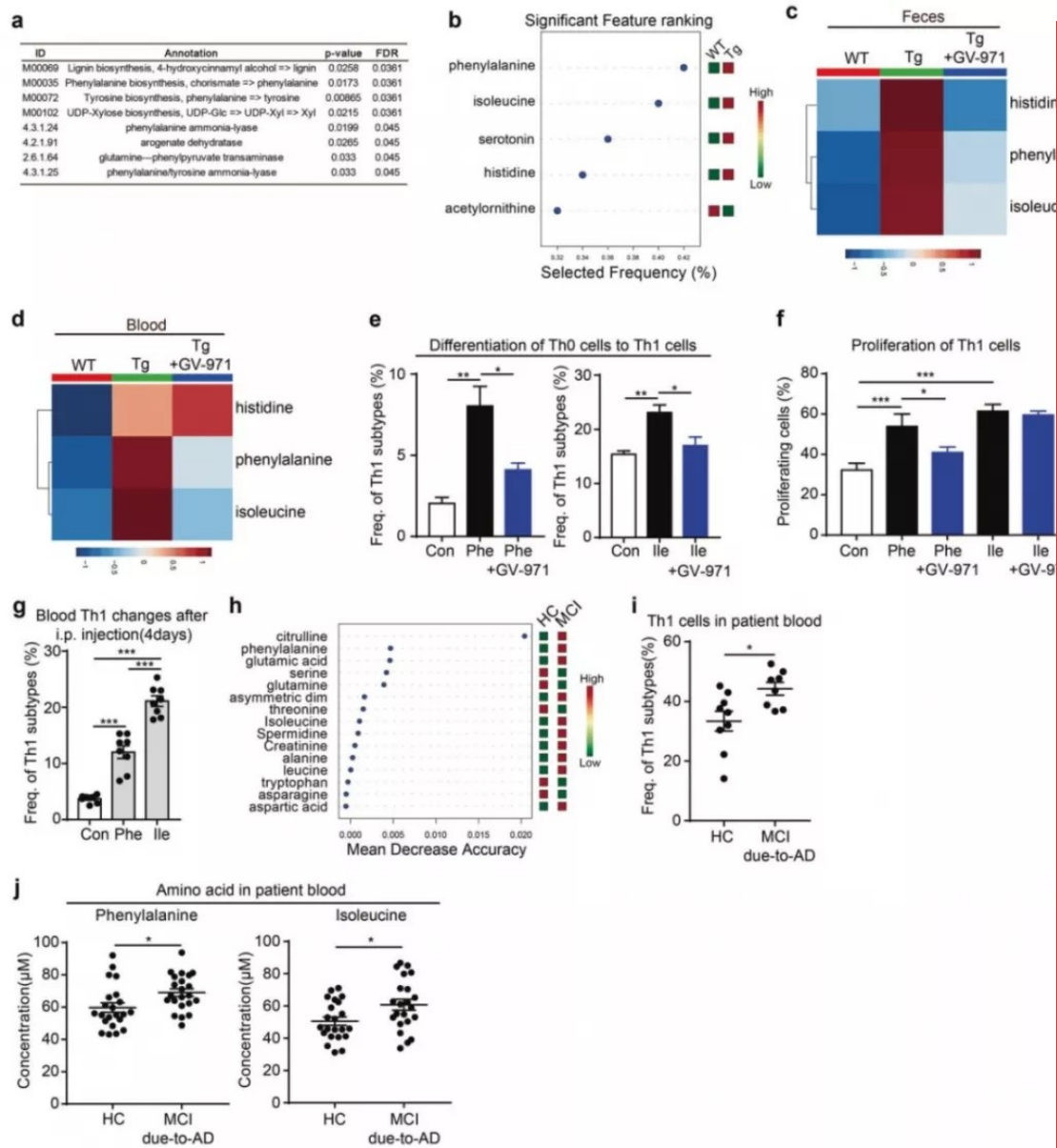
# GV-971通过塑造肠道菌群来减轻神经炎症



7月龄Tg小鼠口服GV-971一个月后，肠道菌群组成发生了明显的双向变化。与肠道菌群的变化一致，GV-971治疗打破了之前脑内免疫细胞与肠道菌群间的相关性，脑内Th1细胞的比例和小胶质细胞的活化显著降低，多种细胞因子水平显著下降。同时，GV-971治疗显著降低了Tg小鼠脑内A $\beta$ 斑块沉积和Tau蛋白的磷酸化，改善了其辨别学习能力。以上结果表明，GV-971可以通过调节肠道菌群改善神经炎症和认知功能障碍。



# GV-971通过调节氨基酸代谢抑制神经炎症



肠道微生物的相关代谢物可能影响宿主的免疫系统。7月龄 Tg小鼠粪菌的体外培养上清可以刺激naive CD4+ T细胞分化成Th1细胞，而GV-971治疗后的粪菌上清抑制了Th1细胞的分化。说明菌群产生的相关代谢产物可以调节免疫细胞分化。

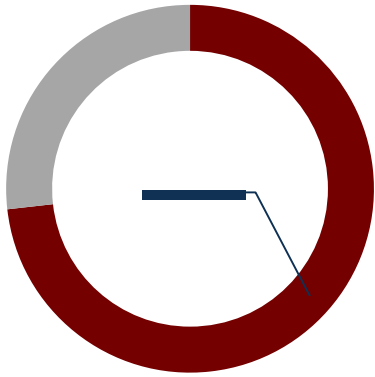
通过非靶向代谢组检测，发现了WT、Tg和GV-971治疗的Tg小鼠粪便中的31种差异代谢物。通路富集分析表明，这些代谢物主要属于氨基酸相关代谢通路，特别是苯丙氨酸相关通路。随机森林分析显示，WT和Tg小鼠血液中的苯丙氨酸是差异最大的氨基酸，其次是异亮氨酸、血清素、组氨酸和乙酰氨基酸。Tg小鼠粪便和血液中苯丙氨酸和异亮氨酸的浓度明显高于WT小鼠，而GV-971处理使其恢复到正常水平。

氨基酸可以通过特异性的转运体被免疫细胞摄取，促进免疫细胞的分化和增殖。苯丙氨酸或异亮氨酸能刺激naive CD4+ T细胞分化成Th1细胞，并促进Th1细胞的增殖，而GV-971处理会抑制这一过程。给WT小鼠腹腔注射苯丙氨酸或异亮氨酸后，其血液中的Th1细胞也显著增加。

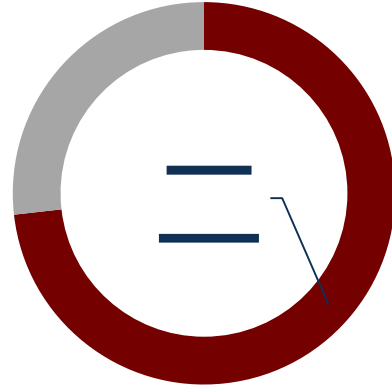
# 分析讨论



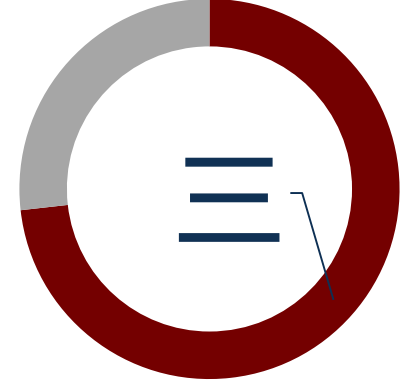
## 讨论



在AD发展过程中，肠道菌群组成发生改变，导致苯丙氨酸和异亮氨酸在外周积累，刺激Th1细胞的分化和增殖。而大脑浸润的Th1细胞引起M1小胶质细胞活化，导致AD相关神经炎症和认知功能障碍。

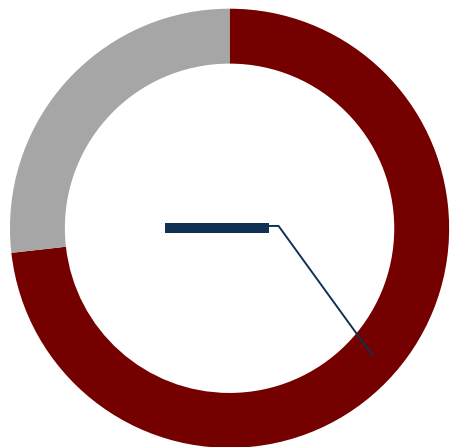


抗AD新药GV-971通过抑制肠道菌群失调和相关苯丙氨酸/异亮氨酸的积累，减轻神经炎症，从而改善认知障碍。

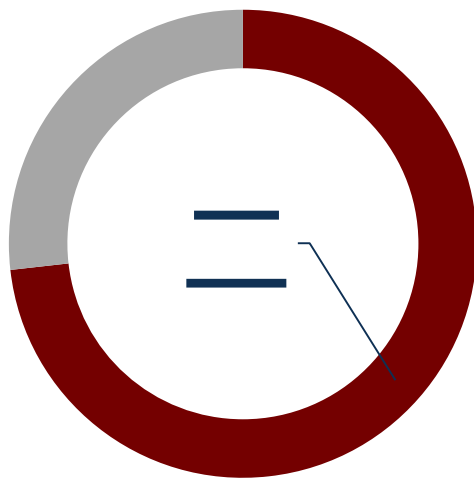


本研究揭示了肠道菌群在AD发生发展中的作用，并提出了一种通过重塑肠道菌群来治疗AD的新策略。

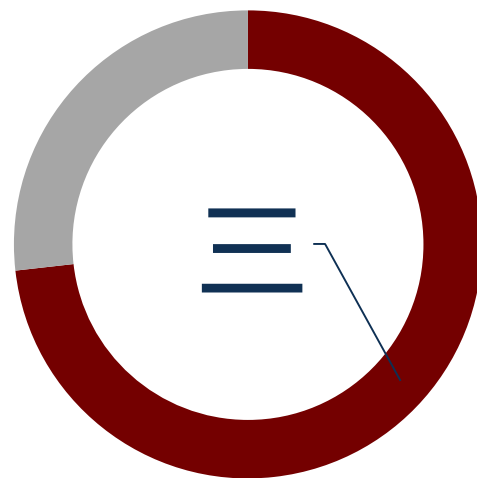
## 我学习到什么



**每一项成果的背后都是无数人为之努力的，不断地在失败中寻找原因，才能获得成功。**



**团队合作十分重要，成功往往不是只依靠一个人的努力，是所有人一起奋斗。**



**要做出一张好看的图，不仅要学会配比颜色，还要学会调整比例。**



# 请老师批评指正

PRESENTED BY 赵一夫

