

脊髓法猴体神经毒力试验对恒河猴肠道菌群的影响研究

赵 远 王 玺 马 进 杨凤梅 禹文海 和占龙

摘 要 **目的** 探讨脊髓注射法猴体神经毒力试验对肠道菌群的影响。**方法** 用Ⅲ型脊髓灰质炎减毒活疫苗进行脊髓法猴体神经毒力试验,收集3只神经毒力试验恒河猴及3只健康恒河猴粪便样本,提取细菌总DNA,采用新一代高通量测序技术对16S rRNA基因的V3~V4高变区测序并进行物种分类、丰度及多样性分析。**结果** 神经毒力试验对动物脊髓造成不同程度的病理损伤;试验组粪便微生物多样性降低,门水平上两组菌群无差异,优势菌群主要为硬壁菌门、变形菌门及拟杆菌门,占比总和超过95%;属水平上有普雷沃菌属(*Prevotella*)、芽殖菌属(*Gemmiger*)等11种菌属存在显著差异($P < 0.05$)。**结论** 脊髓注射法猴体神经毒力试验对动物造成脊髓损伤并引起粪便内乳酸菌属(*Lactobacillus*)、普雷沃菌属(*Prevotella*)及芽殖菌属(*Gemmiger*)等菌属组成变化,为建立非人灵长类动物脊髓损伤模型提供理论依据。

关键词 脊髓注射 神经毒力试验 恒河猴 肠道菌群 宏基因组

中图分类号 R373.2; R332

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.009

Effect of Intraspinal Neurovirulence Test on the Intestinal Microflora of Rhesus Monkeys. Zhao Yuan, Wang Xi, Ma Jin, et al. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To investigate the effect of spinal cord injection on the intestinal microflora in rhesus monkeys. **Methods** The monkeys were injected with type Ⅲ live attenuated poliomyelitis vaccine into intraspinal. Fecal samples from 3 rhesus monkeys of neurovirulence test and 3 healthy rhesus monkeys were collected. Total bacterial DNAs were extracted and submitted high throughout sequencing on the V3 - V4 viable region of 16S rRNA. Tags and operational taxonomic units (OTU) were then obtained and analysis of taxonomy, abundance and alpha diversity were performed. **Results** The pathological changes of various degree of spinal cord injuries caused by the intraspinal neurovirulence test. Microbial diversity decreased in experimental group. There was no difference between the two groups on the phylum level, and the dominant microbial community in fecal was *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*, accounting for more than 95% of the total; *Prevotella*, *Gemmiger* and other 11 kinds of bacteria had significant difference on the genus level ($P < 0.05$). **Conclusion** Neurovirulence test by in intraspinal injection caused spinal cord injury and caused composition changes of *Lactobacillus*, *Prevotella* and *Gemmiger*. The purpose of this study was to provide theoretical basis for the establishment of non-human primate spinal cord injury model.

Key words Spinal cord injection; Neurovirulence test; Rhesus monkeys; Gut microbiota; Metagenomic

50多年来猴体神经毒力试验在保证疫苗安全性方面做出了巨大贡献。出于对减毒活疫苗的安全性考虑,当从具有中枢神经系统靶向性的野毒株中分离得到减毒疫苗株时,大多数国家的药品注册法规均要求开展猴体神经毒力试验研究,以评价减毒疫苗株的

安全性^[1]。神经毒力试验通常是在减毒疫苗株临床前研究阶段开展,疫苗上市后当发生较重大的工艺变更时,应考虑重新进行神经毒力试验。根据《中华人民共和国药典(三部)》(2015年版)及世界卫生组织(WHO)的相关规定,对于脊髓灰质炎减毒活疫苗,建议对每个批次的单价原液检测神经毒性,并作为放行依据之一^[2]。目前减毒活疫苗的神经毒性评价需通过猴体神经毒力试验进行,主要有两种方法:脊髓法和脑内法,两种方法对于疫苗安全性评价的敏感度基本是一致的^[3]。神经系统组织病理学评价方法是确认神经损伤及其病变可逆性程度的重要手段,也是疫苗神经毒力临床前安全性评价的金标准^[4]。

基金项目:国家医学创新工程项目(CIFMS,2016-I2M-2-001);中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2016ZX310179-3,2016ZX310179-4)

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院医学生物学研究所实验动物部

通讯作者:和占龙,研究员、硕士生导师,电子信箱:hzl@imbcams.com.cn

肠道菌群是由成千上万的不同属的细菌种类,其数量和基因含量超过宿主的 10 ~ 150 倍^[5]。这些共生微生物及其代谢产物对宿主的实质影响,调节免疫系统的功能,内分泌系统,肠神经系统和中枢神经系统^[6-8]。肠道菌群的生长和组成是由众多因素的影响,包括免疫机制,饮食因素与肠蠕动以及神经损伤。猴体神经毒力试验会对动物造成一定程度的脊髓损伤,研究发现各型疫苗病变发生率相似,轻微病变出现的比例最高,较严重的病变主要见于Ⅲ型疫苗^[9]。另外,最新研究表明,肠道菌群对脊髓灰质炎病毒、呼肠孤病毒和小鼠乳腺肿瘤病毒、诺如病毒、轮状病毒等肠道病毒的感染有明显的促进作用^[10-13]。然而,减毒活疫苗,自身保持一定的病毒活性,注射到动物机体内是否会对动物肠道菌群有影响?这种注射造成的损伤对肠道菌群是否有影响也尚不清楚,本研究以Ⅲ型脊髓灰质炎减毒活疫苗猴体神经毒力试验恒河猴为模型,采用高通量测序技术对脊髓注射法的恒河猴粪便菌群 16S rRNA 基因 V3 ~ V4 高变区进行测序,再与 Silva 数据库中的基因序列进行比对,得到样品中所含有的微生物种类及丰度,分析菌群结构及多样性,与正常动物进行比较。旨在探讨猴体神经毒力试验与肠道菌群的关系,为疫苗安全性评价提供参考,也为建立非人灵长类动物脊髓损伤模型提供理论依据。

材料与方法

1. 实验动物:普通级健康恒河猴,来自中国医学科学院医学生物学研究所灵长类中心[SCXK(滇)K2015-0004]。年龄 1.5 岁,体重 1.8 ~ 2.5 kg,实验前至少 6 周检疫期,检测排出肠道致病菌、泡沫病毒病(SFV)和猴 B 病毒(BV),猴结核菌素试验为阴性,单笼隔离饲养于中国医学科学院医学生物学研究所的普通环境[SYXK(滇)K2014-0007],饲喂相同饲料。

2. 动物实验及采样:用Ⅲ型脊髓灰质炎减毒活疫苗进行脊髓法猴体神经毒力试验的动物为试验组(T),同时设 3 只未进行神经毒力试验动物做对照组(C)。实验猴在注射给药 21 天后,进行安乐死并解剖,完整取出脊髓,10% 甲醛溶液充分固定后,进行取材,做中枢神经系统病理组织学检查;随机抽取试验组动物 3 只和对照组动物 3 只,无菌采集新鲜粪便各 3g 到无菌 EP 管中,所有样品置于 -80℃ 保存。

3. 细菌基因组提取:取冻存的粪便样品,加入适量钢珠和 800 μl SLX,在破碎仪上进行破碎,按 OME-

GA 试剂盒 E. Z. N. A™ Mag - Bind Soil DNA Kit 的试剂盒使用说明书操作步骤提取 DNA。

4. PCR 扩增:利用 Qubit2.0 DNA 检测试剂盒对基因组 DNA 精确定量,PCR 所用的引物已经融合了 Miseq 测序平台的 V3 ~ V4 通用引物 F341: 5' - CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG (barcode) CCTACGGGNGGCWGCAG - 3'; R805: 5' - GACTG-GAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCAGACTACHVGG-GTATCTAATCC - 3'。为了确定测序的样品来源,PCR 引物中标签序列的插入位置标记为 barcode,引物中 barcode 前面的序列是接头序列,用于识别测序位置,barcode 后面的序列是引物序列。通过两轮 PCR 扩增并完成接头序列的连接,PCR 产物进行琼脂糖电泳检测,选用 0.8 倍的磁珠处理纯化回收 DNA,利用 Qubit2.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量,每个样品 DNA 量取 10 ng,最终上机测序及部分数据分析由上海生工生物工程有限公司完成。

5. 宏基因组测序:Miseq 测序序列中含有 barcode 序列,以及测序时加入的引物和接头序列。首先需要去除引物接头序列,再根据 PE reads 之间的 overlap 关系,将成对的 reads 拼接(merge)成一条序列,然后按照 barcode 标签序列识别并区分样品得到各样本数据,去除各样本中 reads 尾部质量值在 20 以下的碱基,切除 reads 中含 N 部分序列,并去除数据中的短序列,长度阈值 200 bp,随后再对低复杂度的序列进行过滤,最终得到各样本有效数据。

6. 生物信息学数据分析:(1)操作单元(operational taxonomic units, OTU)聚类分析:将所有样本序列按照序列间的距离进行聚类,使用 Usearch 软件(版本 5.2.236)进行序列的生物信息学分析,与 silva 数据库中已比对的 16S 核糖体序列数据库进行比对,后根据序列之间的相似性 97% 以上的序列生成不同的操作分类单元(OTU),用 R 软件(版本 3.2)在门水平制作图比较各门相对丰度的多少。(2)菌群多样性分析:根据 OTU 聚类分析结果,进行 alpha 多样性分析,采用 Chao1、Ace、Shannon、Simpson、Coverage 指数分别对样本进行多样性分析。(3)在属水平,比较组间的微生物相对丰度及差异。利用 R 软件对物种分类学统计结果进行作图比较组间的代表性菌属。(4)采用 PICRUSt(版本 1.0.0)根据测序微生物基因组的基因功能的构成生成每个样品中所有 OTU 各个分子通路,设置检验方法为 Welch's t - test 和校正方法 FDR 做 Multiple test correction 预测组间

两两间差异的微生物功能通路。

结 果

1. 脊髓病变情况:正常对照组脊髓照片,可见神经细胞形态良好,多而清晰,胶质细胞分布均匀无增生与聚集。而实验组照片显示:脊髓断区域胶质细胞

弥漫性增生,针迹明显,可见血管袖套与多个胶质小结,神经细胞损伤明显,大部分神经细胞消失甚至损伤殆尽,前角大部分神经细胞消失,背核处神经细胞虽暂未累及但也已出现深染、固缩的不良改变(图1)。

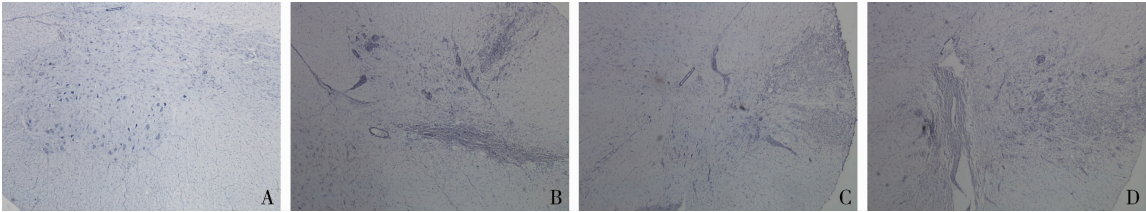


图1 脊髓病变(没食子蓝染色,×40)
A. 正常对照组;B、C、D. 实验组

2. 测序质量评价:运用 PCR 方法扩增细菌 16S rRNA 基因进行高通量测序,两组动物粪便菌群共获得 84464 条有效序列,经过 97% 相似度归并后得到 1614 个 OTUs;通过 Shannon 指数、ACE 指数、Chao1

指数、Coverage、Simpson 评估指数分别对样本进行多样性及丰富度分析,结果表明本实验每个样品的多样性及丰富度分析足以完整描述该样品菌群的组成,且试验组较对照组微生物多样性降低,详见表1。

表1 Alpha 多样性指数统计表

样本	序列数	97% 相似性水平					
		OTU	Shannon 指数	ACE 指数	Chao1 指数	Coverage 指数	Simpson 指数
C	45656	927	4.51	1113.84	1065.00	1.00	0.04
T	38808	687	4.19	837.87	827.23	1.00	0.05

3. 门水平试验组与对照组粪便微生物比较:在门水平进行比较发现,门水平两组微生物优势菌群相似度较高,试验组与对照组粪便优势微生物为硬壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)及变形菌门

(*Proteobacteria*),3种菌门在粪便中的占比总和超过95%。其中硬壁菌门占比最高,试验组拟杆菌门占比高于对照组,而变形菌门占比低于对照组,见图2。

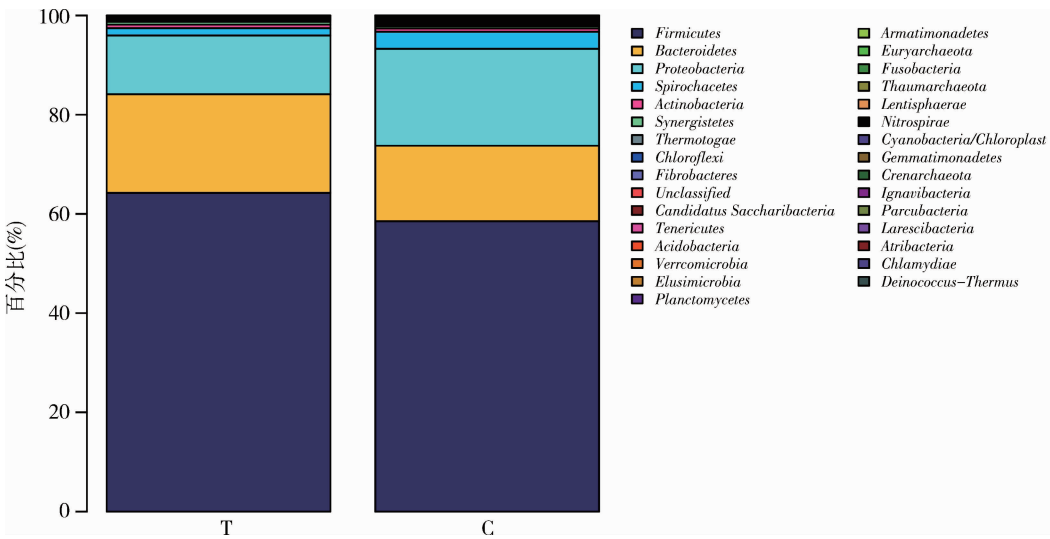


图2 门水平试验组及对照组粪便微生物分布情况

4. 属水平试验组与对照组粪便微生物的比较:为进一步了解试验组与对照组间粪便差异菌属的代表菌属,根据标准化微生物丰度数据和微生物之间的相似度关系得到聚类后的属水平菌群相对丰度饼图(图3)。如图3所示,在属水平上试验组与对照组比较,菌群组成差异较大,实验组粪便内乳酸菌属(*Lactobacillus*, 19.01%)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*, 13.29%)、螺杆菌属(*Helicobacter*, 7.49%)、链球菌属(*Streptococcus*, 4.15%)、颤杆菌属(*Oscillibacter*,

3.98%)、*Flavonifractor* (3.09%)、芽殖菌属(*Gemmiger*, 3.09%)等为优势菌属;而正常对照组中以螺杆菌属(*Helicobacter*, 14.94%)、乳酸菌属(*Lactobacillus*, 7.55%)、颤杆菌属(*Oscillibacter*, 7.19%)、孢杆菌属(*Sporobacter*, 5.5%)、*Barnesiella* 属(5.23%)、链球菌属(*Streptococcus*, 4.74%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 4.05%)等为优势菌属。其中,实验组中的乳酸菌属、普雷沃氏菌属、芽殖菌属占比明显较对照组中高。

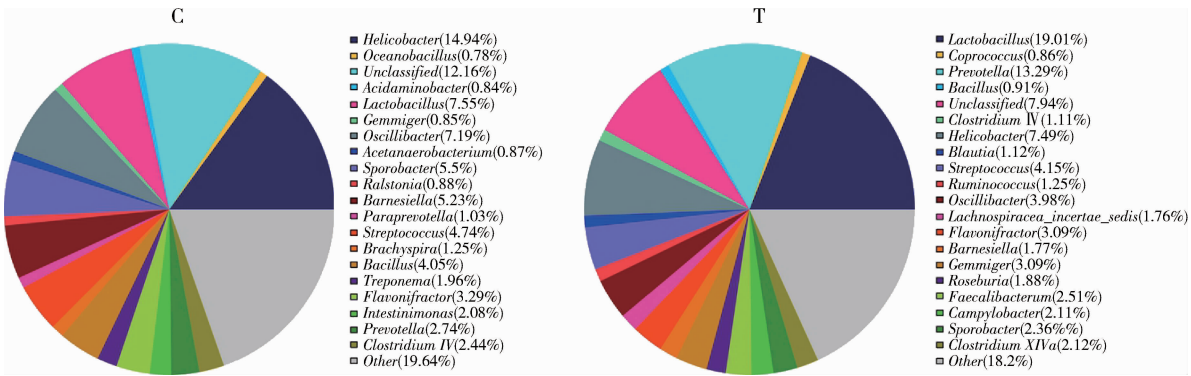


图3 试验组与对照组粪便微生物属比较

5. 属水平组间差异研究:为进一步分析实验组与对照组物种丰富度的差异,基于物种分类结果,计算在不同水平上各 rank 的丰度,比较组间丰度差异,找出组间丰度存在显著差异的物种分类,笔者对样品门和属的水平进行了比较,筛选条件为 $P < 0.05$ (图4)。从图4可以看到,在门水平上组间物种无差异;

而在属水平上, *Guggenheimella* 属、*Oligosphaera* 属、优杆菌属(*Eubacterium*)、紫单胞菌属(*Paludibacter*)、*Anaerostipes* 属、芽殖菌属(*Gemmiger*)、普雷沃菌属(*Prevotella*)、葡萄球菌属(*Turicibacter*)、罗氏菌属(*Roseburia*)、*Holdemanella* 属、*Anaerosolibacter* 属等 11 个物种差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

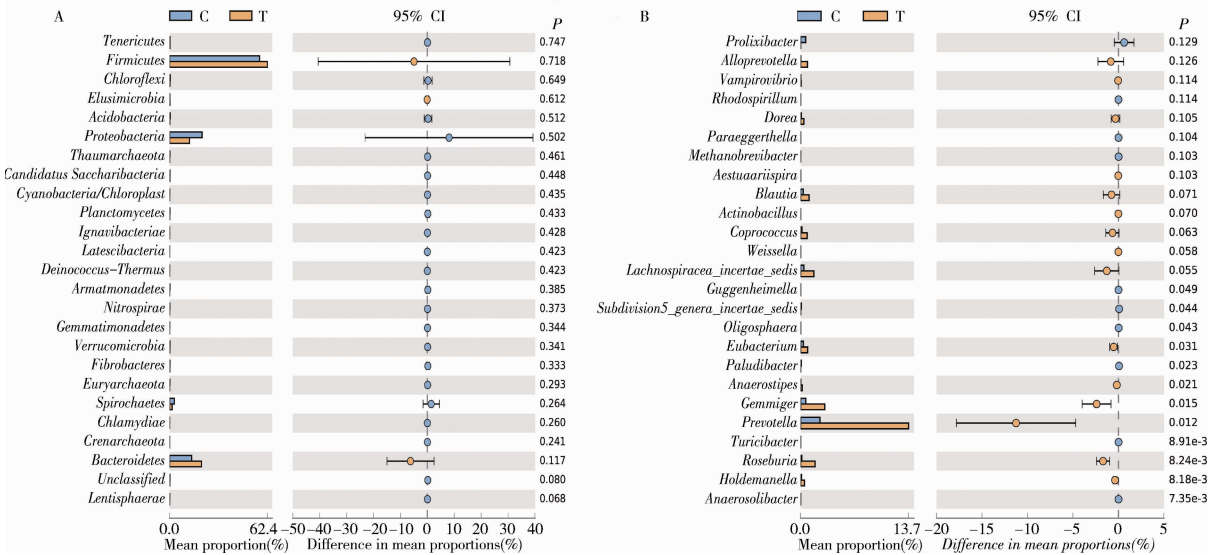


图4 试验组与对照组粪便微生物组间差异比较

A. 门水平差异比较图; B. 属水平差异比较图; 图中所示为不同物种分类在两个组中的丰度比例, 中间所示为 95% 置信度区间内, 物种分类丰度的差异比例, 物种分类用红色标识

6. 试验组与对照组粪便微生物功能差异分析:实验使用每个样品 OUT 丰度数据在 PICRUST 中进行了微生物功能预测。结果显示,尽管实验组与对照组

之间的功能通路差异无统计学意义(图 5)。但实验组在碳水化合物代谢、转录、翻译、复制与修复等通路上略高于实验组。

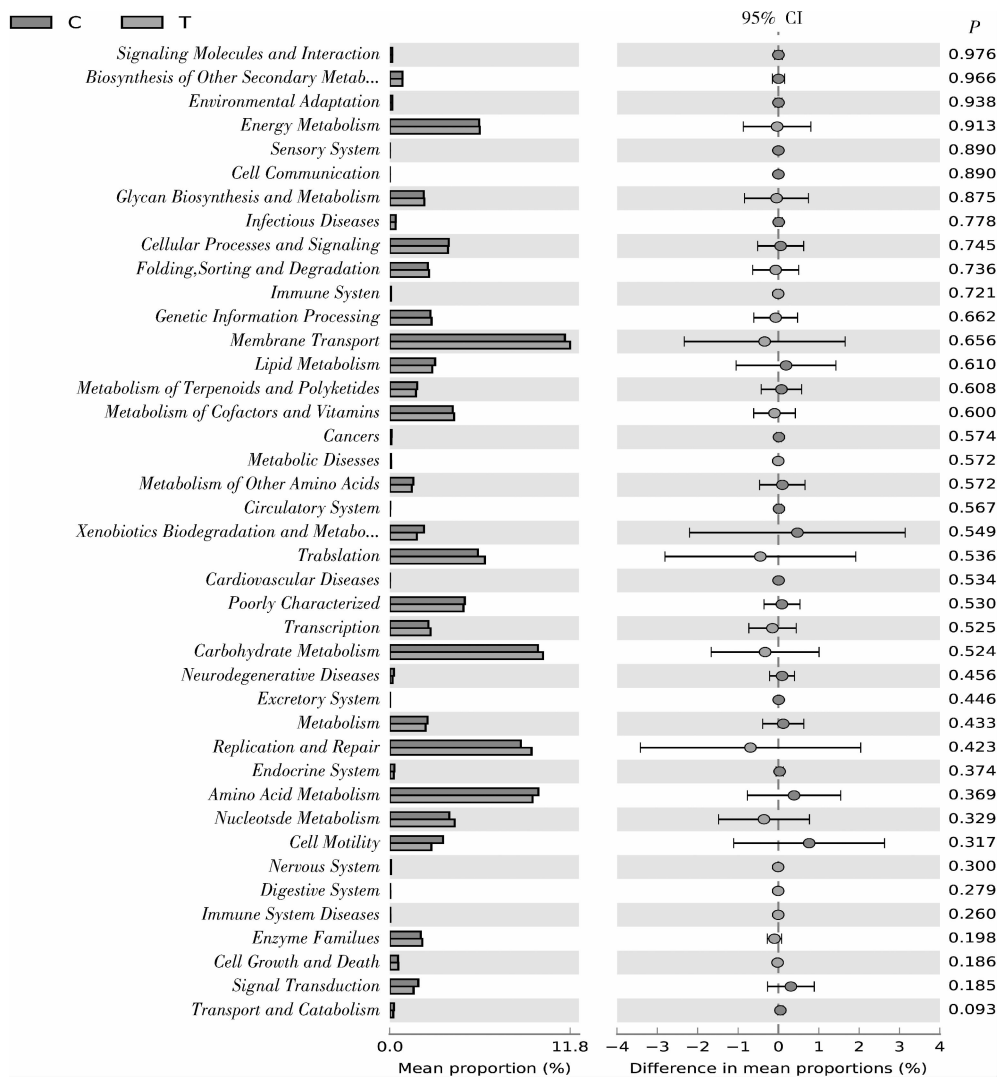


图 5 实验组与对照组粪便微生物功能差异图

讨 论

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种高致残性中枢神经系统损伤性疾病,很难在临床病理学上开展系统的研究,建立脊髓损伤模型进行病理学研究意义重大,可以为临床治疗提供实验依据。该模型在实验动物的选择上应尽量考虑生物学特性与人类接近,国内外常用的实验动物主要由大小鼠、兔、狗、猪等。目前,由于成本及操作难度的考虑,大鼠在脊髓损伤模型的制备应用最为广泛^[14]。然而,非人灵长类动物生理构造与人类最为接近,在手术操作实感与人极为相似,是最好的实验动物。本实验组织病理结果显示:脊髓胶质细胞弥漫性增生,大部分神经细胞受损

甚至损伤殆尽,说明脊髓注射法神经毒力试验对动物造成不同程度的脊髓损伤。该结果为利用非人灵长类动物建立 SCI 模型提供了参考依据。

有研究表明,SCI 使机体多个器官受累及出现功能障碍,尤其是肠道蠕动功能障碍更加明显^[15]。损伤后可立即出现直肠、结肠功能障碍^[16]。大多数 SCI 患者会出现腹痛,便秘及腹痛和便秘相关综合征,并随时间的推移而逐渐加重^[17]。同时,SCI 改变了肠道内细菌的种类,增加肠道通透性和肠道细菌易位,这些变化会加剧神经损伤的程度并损害功能的恢复^[18]。本实验通过宏基因组学的方法检测神经毒力试验恒河猴与正常恒河猴粪便微生物组成,避开传统

活菌培养耗时较长、细菌生长条件特殊、培养技术复杂等缺点,对肠道菌群进行整体分析,结果较为准确和完整^[19]。通过实验发现两组动物门水平上的优势菌群为硬壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)及变形菌门(*Proteobacteria*),这与已报道的基本一致^[20],且试验组拟杆菌门占比明显高于对照组,通过对两组动物属水平的比较发现,试验组中的优势菌属普雷沃菌属(*Prevotella*)和芽殖菌属(*Gemmiger*)占比明显高于正常对照组($P < 0.05$),普雷沃菌属属于拟杆菌门,说明拟杆菌门(*Bacteroidetes*)门水平上的差异,主要是由普雷沃菌属(*Prevotella*)属引起的,而其他占比较低的 9 种小菌属如罗氏菌属(*Roseburia*)、优杆菌属(*Eubacterium*)、*Holdemanella* 属、*Anaerostolobacter* 属等与正常对照组间也有显著差异($P < 0.05$)。

在人类研究中,随着生活方式的变化,包括环境卫生改善、接种疫苗,抗生素的使用增加,寄生虫感染下降,幽门螺杆菌感染的下降,拥挤的生活条件,久坐不动的生活方式,食品加工,饮食改变等,导致肠道微生物群的变化^[21]。研究表明,普雷沃菌属(*Prevotella*)可以作为疾病预兆的生物学指标^[22]。普雷沃菌作为人类大肠内的共生微生物,其能广泛降解植物多糖的能力越来越引起了人们的关注。Kang 等^[23]的研究表明,自闭症儿童粪便样品中该菌属显著下降。而笔者的研究结果显示,实验组中该菌属明显高于对照组($P < 0.05$),可以推测实验用动物在单笼饲养状态下未出现类似自闭症的情况从而影响实验结果。

本研究笔者发现脊髓注射法神经毒力试验对动物造成的脊髓损伤的确引起动物肠道菌群的改变,然而,这种改变与人类 SCI 患者的肠道微生物变化有所不同,Gungor 等^[24]的研究显示,SCI 患者肠道优势菌群为 *Blautia*、*Bifidobacterium*、*Faecalibacterium* 和 *Ruminococcus*,而本研究结果显示脊髓注射法神经毒力试验后动物肠道内 *Lactobacillus*、*Prevotella*、*Gemmiger* 等菌属明显增加,该结果与人类术后肠道菌群的改变相似^[25]。说明脊髓注射法猴体神经毒力试验对猴子造成的脊髓损伤与脊髓注射的手术损伤有关,该结果为建立非人灵长类动物脊髓损伤模型提供理论依据。另外,尽管肠道微生物基因功能通路的差异无统计学意义,但实验组在碳水化合物代谢、转录、翻译、复制与修复等通路上略高于实验组,该结果也与肠道优势菌群的组成由密切关系。

参考文献

- European Pharmacopeia Commission. Tests for neurovirulence of live virus vaccines (General method No. 2.6.18)//European Pharmacopeia 7. 0 [S]. Strasbourg:European Directorate for the Quality Control of Medicines,1997:99
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版第三部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:3305
- 谢忠平,陈瀚博,沈冬,等. 口服脊髓灰质炎减毒活疫苗猴体神经毒力试验病理结果分析[J]. 中国生物制品学杂志,2007,20(3):206-208,218
- Moser VC. Functional assays for neurotoxicity testing[J]. Toxicol Pathol, 2011, 39(1):36-45
- Dethlefsen L, Mcfall - Ngai&Amp M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human - microbe mutualism and disease. [J]. Nature, 2007, 449(7164):811-818
- Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(5):313-323
- Forsythe P, Kunze WA. Voices from within: gut microbes and the CNS[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(1):55-69
- Cryan JF, Dinan TG. Mind - altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour[J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13(10):701-712
- 徐艳峰,邓巍,于品,等. 脊髓灰质炎疫苗脑内法猴体神经毒力试验病理学评价方法的探讨[J]. 中国比较医学杂志,2016,26(10):1-4
- Kernbauer E, Ding Y, Cadwell K. An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria [J], Nature, 2014, 516(7529):94-98
- Jones MK, Watanabe M, Zhu S, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells[J]. Science, 2014, 346(6210):755-759
- Karst SM. The influence of commensal bacteria on infection with enteric viruses[J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14(4):197-204
- Uchiyama R, Chassaing B, Zhang B, et al. Antibiotic treatment suppresses rotavirus infection and enhances specific humoral immunity [J]. J Infect Dis, 2014, 210(2):171-182
- Mandalari G, Genovese T, Bisignano C. et al. Neuroprotective effects of almond skins in experimental spinal cord injury [J]. Clin Nutr, 2011,30(2):221-233
- Alexander MS, Biering - Sorensen F, Bodner D, et al. International standards to document remaining autonomic function after spinal cord injury [J]. Spinal Cord, 2009, 47(1):36-43
- Korsten MA, Singal AK, Monga A, et al. Anorectal stimulation causes increased colonic motor activity in subjects with spinal cord injury [J]. Spinal Cord Med, 2007, 30(1):31-35
- Faaborg PM, Christensen P, Finnerup N, et al. The pattern of colorectal dysfunction changes with time since spinal cord injury [J]. Spinal Cord, 2008, 46(3):234-238
- Kigerl KA, Hall JC, Wang L, et al. Gut dysbiosis impairs recovery after spinal cord injury[J]. J Ex Med, 2016, 213(12):2603

经后期才开始降低(>5 年)。

IL-10 是 18kDa 多肽,来源于 Th2 细胞,通过抑制(IL-1、TNF- α)下调 T 细胞免疫,诱导 B 细胞产生大量 IgG、IgA、IgM。E₂ 对 IL-10 水平的影响虽然没有其他细胞因子显著,但 E₂ 通过刺激 IL-10 产生而提高免疫球蛋白量,促进机体呈现为 Th2 型细胞因子模式^[17]。本研究 3 组实验组(即手术去卵巢组、药物去卵巢组和自然绝经组)IL-10 水平略低于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。因此 E₂ 缺乏是否降低 IL-10 产生并导致机体呈现为 Th1 型细胞因子模式值得进一步探讨。

总之,笔者发现 Con-A 刺激后 E₂ 缺乏状态下年轻与老龄化 C57BL/6N 小鼠之间细胞因子模式是有所不同的,自然绝经组脾脏表达 IL-6、IL-2 和 TNF- α 较年轻非自然绝经组(手术去卵巢组和药物去卵巢组)高,说明 E₂ 对 IL-6、IL-2 和 TNF- α 作用有限,E₂ 是否通过影响其他细胞因子表达而参与免疫老化改变仍需进一步实验证实。

参考文献

- Liu L, Zhao Y, Xie K, *et al.* Estrogen inhibits LPS-induced IL-6 production in macrophages partially via the nongenomic pathway[J]. *Immunol Inves*, 2014, 43(7):693-704
- Sivro A, Lajoie J, Kimani J, *et al.* Age and menopause affect the expression of specific cytokines/chemokines in plasma and cervical lavage samples from female sex workers in Nairobi, Kenya[J]. *Immun Ageing*, 2013, 10(1):42
- Priyanka HP, Sharma U, Gopinath S, *et al.* Menstrual cycle and reproductive aging alters immune reactivity, NGF expression, antioxidant enzyme activities, and intracellular signaling pathways in the peripheral blood mononuclear cells of healthy women[J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 32:131-143
- Curran EM, Berghaus LJ, Verneti NJ, *et al.* Natural killer cells express estrogen receptor- α and estrogen receptor- β and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor- α -mediated pathway[J]. *Cell Immunol*, 2001, 214(1):12-20
- Zhao RQ, Zhou MH, Qu W, *et al.* Inhibitory effect of alarelin microspheres on experimental endometriosis in rats[J]. *Acta Pharmaceut*

- Sinic, 1999, 34(8):565-568
- Martins RR, Pereira NM, Silva TM. Liquid-base cytology: a new method for oestral cycle study in Wistar's rats[J]. *Acta Cir Bras*, 2005, 20(1):78-81
- Wang JM, Hou X, Adeosun S, *et al.* A dominant negative ER β splice variant determines the effectiveness of early or late estrogen therapy after ovariectomy in rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e33493
- Gameiro CM, Rom? o F, Castelo-Branco C. Menopause and aging: changes in the immune system-a review[J]. *Maturitas*, 2010, 67(4):316-320
- Xia X, Zhang S, Yu Y, *et al.* Effects of estrogen replacement therapy on estrogen receptor expression and immunoregulatory cytokine secretion in surgically induced menopausal women[J]. *J Reprod Immunol*, 2009, 81(1):89-96
- Ersler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 expression, late-life diseases, and frailty[J]. *Ann Rev Med*, 2000, 51:245-270
- Kotrych D, Dziedzicko V, Safranow K, *et al.* TNF- α and IL 10 gene polymorphisms in women with postmenopausal osteoporosis[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2016, 199:92-95
- Abrahamsen B, Bonnevie-Nielsen V, Ebbesen EN, *et al.* Cytokines and bone loss in a 5-year longitudinal study-hormone replacement therapy suppresses serum soluble interleukin-6 receptor and increases interleukin-1-receptor antagonist: the danish osteoporosis prevention study[J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(8):1545-1554
- Kamada M, Irahara M, Maegawa M, *et al.* Postmenopausal changes in serum cytokine levels and hormone replacement therapy[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 184(3):309-314
- 邵明君,胡旻,何云芹,等.雌激素对去卵巢小鼠肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素 6 水平的影响[J]. *生殖医学杂志*, 2011, 20(5):410-412
- DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, *et al.* Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity[J]. *Biogerontology*, 2006, 7(5-6):471-481
- Yasui T, Maegawa M, Tomita J, *et al.* Changes in serum cytokine concentrations during the menopausal transition[J]. *Maturitas*, 2007, 56(4):396-403
- Zhang J, Lapato A, Bodhankar S, *et al.* Treatment with IL-10 producing B cells in combination with E₂ ameliorates EAE severity and decreases CNS inflammation in B cell-deficient mice[J]. *Metab Brain Dis*, 2015, 30(5):1117-1127

(收稿日期:2017-01-15)

(修回日期:2017-02-27)

(上接第 33 页)

- 李凡,徐志凯.医学微生物学[M].8 版.北京:人民卫生出版社, 2013:132
- Mckenna P, Hoffmann C, Minkah N, *et al.* The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis[J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(2):e20
- Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(4):279
- Wu GD, Bushmanc FD, Lewis JD. Diet, the human gut microbiota, and IBD. [J]. *Anaerobe*, 2013, 24(12):117-120

- Kang DW, Jin GP, Ilhan ZE, *et al.* Reduced incidence of Prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e68322
- Gungor B, Adiguzel E, Gursel I, *et al.* Intestinal Microbiota in Patients with Spinal Cord Injury[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0145878
- Patrone V, Vajana E, Minuti A, *et al.* Postoperative changes in fecal bacterial communities and fermentation products in obese patients undergoing bilio-intestinal bypass[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7:200

(收稿日期:2017-05-03)
(修回日期:2017-05-17)