

药学报
Acta Pharmaceutica Sinica
ISSN 0513-4870, CN 11-2163/R

《药学报》网络首发论文

题目： 预防高原睡眠障碍的鼠李糖乳杆菌-枸杞多糖合生制剂研究
作者： 牛红, 吴艳萍, 杜丽娜, 金义光
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0722
收稿日期: 2024-07-29
网络首发日期: 2024-11-27
引用格式: 牛红, 吴艳萍, 杜丽娜, 金义光. 预防高原睡眠障碍的鼠李糖乳杆菌-枸杞多糖合生制剂研究[J/OL]. 药学报.
<https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2024-0722>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

收稿日期: 2024-07-29; 修回日期: 2024-11-06.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82404486).

*通讯作者 Tel: 86-10-66930216, E-mail: dulina@188.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0722

预防高原睡眠障碍的鼠李糖乳杆菌-枸杞多糖合生制剂研究

牛红^{1,2}, 吴艳萍^{1,2}, 杜丽娜^{1,2*}, 金义光²

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 军事科学院军事医学研究院, 北京 100850)

摘要: 高原睡眠障碍是常见的急性高原疾病, 可引发急性高原反应等生理不适, 临床缺少安全、高效的预防药物。本研究基于肠-脑轴理论, 设计并制备了鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*, LGG) - 枸杞多糖 (*Lycium barbarum* polysaccharide, LBP) 合生制剂。首先, 制备并评价 LGG-LBP 合生制剂, 受试小鼠随机分为正常组、模型组、阳性药乙酰唑胺组、LGG 组、LBP 组、LGG-LBP 合生制剂组, 连续灌胃 7 天后, 采用小动物低压氧舱建立高原睡眠障碍小鼠模型。通过睡眠翻正反射实验、旷场实验、新物体识别实验、外周血细胞水平、血清炎症因子、粪便菌群检测及小肠病理切片, 评价合生制剂的药效。在高原睡眠障碍小鼠模型中, 小鼠提前口服合生制剂可明显改善高海拔环境下的相关表现, 包括延长睡眠时间、提高自主探索能力和短期记忆能力、促进血细胞恢复、降低肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 水平。此外, 该合生制剂还能增加肠道菌群丰度, 改善小肠结构, 减少肠道炎症。LGG-LBP 合生制剂可能是潜在的预防高原睡眠障碍的有效药物。动物实验经军事科学院军事医学研究院伦理委员会批准, 且实验均按相关指导原则和规定进行, 批准号: IACUC-DWZX-2022-511。

关键词: 高原睡眠障碍; 鼠李糖乳杆菌; 枸杞多糖; 合生制剂; 肠-脑轴

中图分类号: R943

文献标识码: A

Synbiotics formulation of *Lactobacillus rhamnosus*-*Lycium barbarum* polysaccharide for the prevention of high-altitude sleep disturbance

NIU Hong^{1,2}, WU Yan-ping^{1,2}, DU Li-na^{1,2*}, JIN Yi-guang²

(1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Science, Beijing 100850, China)

Abstract: High-altitude sleep disturbance is a common acute high-altitude disease that can trigger physiological discomfort such as acute high-altitude reactions, with a lack of safe and effective preventive medications in clinical practice. Based on the gut-brain axis theory, this study designed and prepared a synbiotics combining *Lactobacillus rhamnosus* (LGG)-*Lycium barbarum* polysaccharide (LBP). First, the LGG-LBP synbiotics was prepared and evaluated. The mice were randomly divided into healthy, model, positive control (acetazolamide), LBP, LGG and LGG-LBP synbiotics group. After 7 days of administration, the mouse model of high-altitude sleep disturbance was established, the treating effects were evaluated through sleep duration, behavioral, hemogram test, and the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in blood. 16S rRNA sequencing was used to analyze the changes of gut microbiota, and the pathological changes of small intestine were observed. The LGG-LBP synbiotics prolonged sleep duration, improved exploratory ability and short-term memory, promoted blood cell recovery. Moreover, LGG-LBP synbiotics enhanced the abundance of probiotics in the gut, and reduced intestinal inflammation. LGG-LBP synbiotics may be a potential prophylactic drug for high-altitude sleep disturbance. The animal operation was approved by the Ethics Committee of the Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Science (Approval number: IACUC-DWZX-2022-511). All experiments were conducted in accordance with relevant guidelines and regulations.

Key words: high-altitude sleep disturbance; *Lactobacillus rhamnosus*; *Lycium barbarum* polysaccharide; synbiotics; gut-brain axis

高原是陆地重要组成部分,我国约 1/3 国土面积为高原地区。随着越来越多人群在高海拔地区开展科研、旅游、军事等活动,低氧、低压等高原极端环境对人体机能的影响引起广泛关注,包括呼吸功能^[1]、睡眠障碍等^[2]。其中睡眠障碍已成为急进高原人群的常见问题,也是导致急性高原反应的直接诱因^[3,4]。由于低氧导致的低质量睡眠会加剧急性高原疾病的发病,并加重焦虑、抑郁和其他负面情绪^[5],导致感知、学习、记忆、警觉能力衰退,甚至认知功能障碍^[6-8],严重影响工作、学习、生活。目前,防治高原睡眠障碍的主要手段是药物防治,但现有药

物不良反应较大。如乙酰唑胺具有头痛、恶心、过敏等不良反应，且有引发 Stevens-Johnson 综合症的风险^[9,10]。对睡眠障碍而言，预防比治疗更有意义，因此亟需研发新的高效、安全高原睡眠障碍预防用药。

脑和肠道环境之间存在着密切联系^[11,12]，涉及免疫系统、内分泌系统、神经系统和肠道微生物^[13-15]。肠-脑轴的双向调节可能是睡眠和肠道微生物群相互作用的基础，可直接或间接地参与调节睡眠行为，并可能在睡眠障碍的病因和发病机制中发挥关键作用^[16,17]。短睡眠者的肠道微生物组成与正常睡眠者不同^[18]，因此，肠道微生物群可能是防治高原睡眠障碍的一个重要靶点。

益生菌是有益于宿主健康的活性微生物，具有维持肠道内环境稳态、抑制有害菌生长、调节肠道微生物组成、增强机体免疫力等作用^[19,20]。高原特殊低氧环境可以改变肠道微生物群落的组成^[21,22]。本课题组前期研究发现，高原低氧条件下发生睡眠障碍的小鼠肠道内乳杆菌属水平降低^[23]。鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*, LGG) 是研究较为广泛的益生菌菌株之一，是能产生短链脂肪酸的益生菌，可进入人体肠道，维持肠道健康，改善机体免疫功能和抗氧化能力，对抑郁、焦虑等精神疾病有一定治疗作用^[24]。

多糖作为一种丰富的天然产物，是影响肠道菌群丰度和代谢的益生元，主要通过促进肠道益生菌增殖、增加益生菌丰度对肠道菌群产生影响^[25]。枸杞多糖 (*Lycium barbarum polysaccharide*, LBP) 是从枸杞成熟果实中提取的活性成分，是良好的益生元，可以被肠道菌群代谢产生短链脂肪酸等益生物质，调节肠道菌群^[26]，刺激有益菌生长，提高有益菌水平，丰富肠道菌群多样性，改善肠道生态失调^[27]，且具有抗炎、抗氧化作用等多种药理学功效^[28-30]。海藻酸钠 (*sodium alginate*, SA) 是一种从海藻中提取的天然多糖，将其与 CaCl_2 反应生成凝胶包裹 LGG，可增加 LGG 对胃液的耐受性，有利于 LGG 到达肠道，调节肠道菌群，增强肠道菌群丰度。本研究以肠道菌群作为治疗靶点将 LBP 与 LGG 联合制备成合生制剂口服凝胶，LBP 可以为 LGG 提供营养物质，二者协同通过改善肠道，调节肠道菌群，发挥预防高原睡眠障碍的作用，具有安全、高效的特点。因此，本研究将 LGG-LBP 联合制备得到合生制剂，在高原睡眠障碍小鼠模型上评价了其高原睡眠障碍的预防作用 (图 1)。

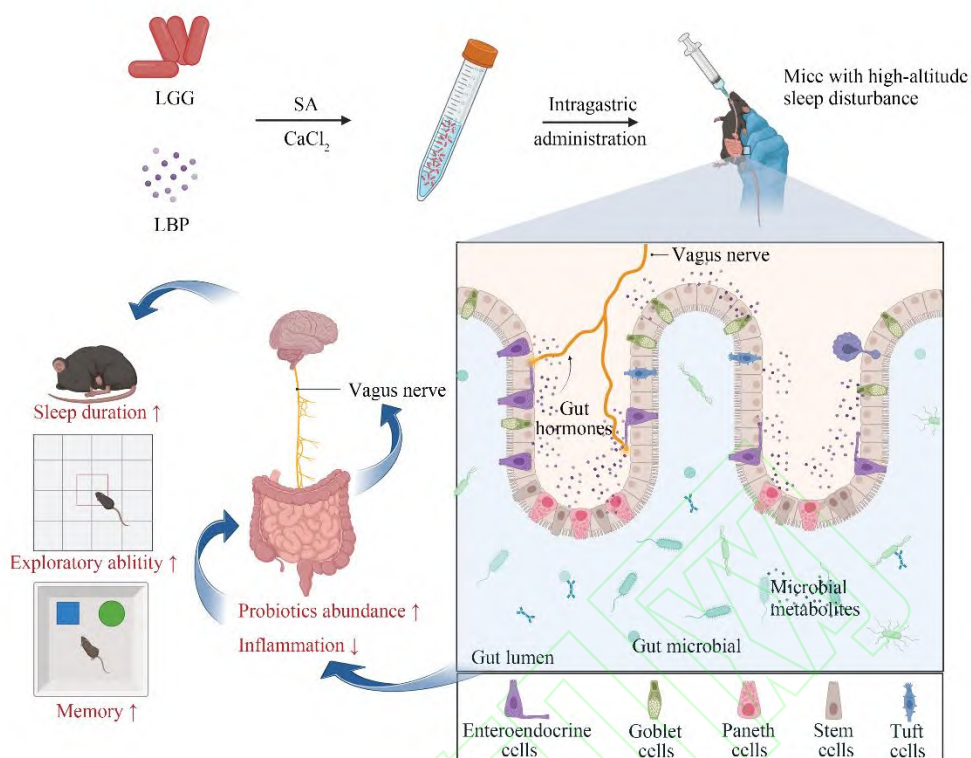


Figure 1 Preparation and pharmacodynamic evaluation of synbiotics

材料与amp;方法

菌株 鼠李糖乳杆菌菌株 (*Lactobacillus rhamnosus*, BNCC 134266), 购于北京北纳创联生物技术研究院。

实验动物 C57BL/6J 小鼠, SPF 级, 健康雄性, 体重 21~23 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2021-006。动物实验经军事科学院军事医学研究院伦理委员会批准, 且实验均按相关指导原则和规定进行, 批准号: IACUC-DWZX-2022-511。

药物与试剂 MRS 培养基 (批号: 715J031)、枸杞多糖 (批号: 2230815002)、维生素 B₁ (批号: 827S036) 和酪蛋氨酸 (批号: 1029M032) 购于北京索莱宝科技有限公司; 琼脂 (批号: EZ7890D190) 购于赛国生物科技有限公司; 磷酸二氢钾 (批号: 20210418)、磷酸氢二钾 (批号: 20150828)、磷酸二氢铵 (批号: F20080314)、硫酸镁 (批号: 20140822)、葡萄糖 (glucose, GLU, 批号: 20131025) 购于国药集团化学试剂有限公司; 海藻酸钠 (批号: C13225218) 购于上海麦克林

生化科技股份有限公司; 氯化钙 (批号: 1911272) 购于西陇科学股份有限公司; 乙酰唑胺 (批号: L07562) 购于 Alfa 试剂有限公司; 小鼠诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 检测试剂盒 (批号: 221486B)、小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 检测试剂盒 (批号: 220852B) 购于南京博研生物科技有限公司。

仪器 超净台 (YT-CJ-2D, 北京亚太科隆仪器技术有限公司); 倒置光学显微镜 (BDS400, 重庆奥特光学有限公司); 旷场实验箱 (ZS-Lab Maz-III)、旷场视频分析系统 (ZS-001) 北京众实迪创科技发展有限公司); 冷冻干燥机 (LGJ-30F, 北京松源华兴科技有限公司); 酶标仪 (Biotek EL \times 800, 美国 Biotek instruments 公司); 全自动血细胞分析仪 (MEK-7222K, 日本光电株式会社); 扫描电镜 (Hatachi SU 8010, 日本日立株式会社); 小动物低压氧舱 (Pro Ox-830, 上海塔望智能科技有限公司); 细菌培养箱 (MF250A, 浙江华盛源仪器有限公司)。

LGG 培养及生长曲线的建立 配制 MRS 肉汤培养基 (每 100 mL 中含有 MRS 肉汤 4.83 g), 121 °C 高压灭菌 20 min, 冷却待用。LGG 菌种从-80 °C 取出后在 37 °C 下融化, 振摇均匀后取菌液 200 μ L 加入含有 10 mL 液体培养基的无菌离心管中, 转移至厌氧培养袋, 37 °C 恒温静置培养 48 h。

将培养后的 LGG 菌液用 PBS 分别按照 1 : 0、1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6、1 : 7、1 : 8、1 : 9 (v/v) 进行稀释, 稀释好的样品分别取 200 μ L 置于 96 孔板中, 测定其在 600 nm 处的光密度 (optical density, OD) 值。此外, 稀释好的样品分别利用细菌计数仪进行计数, 依据所测 OD 值与细菌数绘制 LGG 生长曲线。

LGG 在不同培养基中的生长 取 28 mmol \cdot L⁻¹ 磷酸二氢钾、28 mmol \cdot L⁻¹ 磷酸氢二钾、16 mmol \cdot L⁻¹ 磷酸二氢铵、1 mmol \cdot L⁻¹ 硫酸镁、0.1%酪蛋白氨基酸 (w/v)、1%维生素 (w/v)、1%矿物质溶液 (v/v) 混合均匀, 配制无碳源培养基, 灭菌备用。取无碳源培养基分别加入 GLU 和 LBP, 配制 2%葡萄糖培养基 (w/v)、2% LBP 培养基 (w/v), 除菌备用。3 组培养基分别加入定量的 LGG 菌液, 置于厌氧培养袋内, 37 °C 恒温培养, 分别于 12、24、36 h 取菌液测定其在 600 nm 处的 OD 值, 计算细菌数, 通过检测 LGG 在不同培养基中的生长数目, 考察 LBP 对 LGG 的益生作用。

合生制剂的制备 取 50 mL LGG 菌液, 用 PBS 重悬至 10 mL, 0.1 g SA、0.2 g LBP 溶于其中, 搅拌下缓慢滴入 1 mL 1%CaCl₂ 溶液 (w/v) 中, 搅拌均匀至形成凝胶状, 备用。采用 1.0 mL 注射器考察 SA 凝胶的可注射性。

SA 凝胶合生制剂对胃肠环境的耐受实验 口服益生菌的一大难题在于无法耐受胃肠道环境, 极大限制了益生菌的活菌数量, 从而影响了治疗效果。将载 LGG 的合生制剂与人工胃液 (simulated gastric fluid, SGF) 和人工小肠液 (simulated intestine fluids, SIF) 共孵育, 评价合生制剂对益生菌的保护作用。分别取 A、B、C 共 3 管各加 200 μ L 菌液离心, A 管中 LGG 用 SA 凝胶包裹 (LGG@SA gel, LSG), B、C 管用无菌 PBS 重悬。分别取 A、B 管中各 100 μ L 悬液, 置于 SGF 中, 同时将 A、B 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱厌氧孵育 1.5 h, 无菌 PBS 洗涤 2 次; 转移到 SIF 中孵育 3 h, 孵育结束后离心洗涤; 无菌 PBS 重悬, 各取 200 μ L 菌液涂布于 MRS 固体培养板中; 取 C 管悬液加入 PBS 作平行对照。通过平板菌落生长情况评价合生制剂对胃酸的耐受性。

SA 凝胶合生制剂体外释放模拟实验 将凝胶分别置于 SGF、SIF 和人工结肠液 (simulated colon fluids, SCF) 中 ($v/v=1:10$), 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中以 80 $r\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度振荡培养, 每隔 0.5 h 取样 200 μ L, 测定其在 600 nm 处的 OD 值。

合生制剂的内部形态表征 将合生制剂在液氮中进行脆断, 切出横截面样品, 冷冻干燥; 将样品用黑色导电胶带固定在样品台上, 喷金后, 采用扫描电镜在 5 kV 条件下观察凝胶内部形态。

分组和建模 C57BL/6J 小鼠适应性饲养 4 天后随机分为 6 组, 正常组 (Healthy, 生理盐水 0.2 $\text{mL}\cdot\text{d}^{-1}$)、模型组 (Model, 生理盐水 0.2 $\text{mL}\cdot\text{d}^{-1}$)、合生制剂组 (Synbiotics, 0.2 $\text{mL}\cdot\text{d}^{-1}$) 每组 8 只, 阳性药组 (Acetazolamide, 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、LBP 组 (LBP 溶液, 160 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、LGG 组 (LGG 混悬液, 10^9 CFU $\cdot\text{d}^{-1}$) 每组 5 只, 连续给药 7 天。最后一次给药后, 除正常组外, 其余小鼠放入小动物低压氧舱建立高原睡眠障碍模型。设置氧舱海拔高度为 6000 m, 温度 24 $^{\circ}$ C, 湿度 56%, 换气频率每小时 6 次, 每次持续时间 5 min, 进气量 10 $\text{atmNI}\cdot\text{min}^{-1}$, 抽气量 30 $\text{atmNI}\cdot\text{min}^{-1}$, 氧浓度维持 20%, 氧分压 8.5 kPa, 舱内压力 -58 kPa, 并调节仪器海拔上升速度, 使仪器在 30 min 内升至目标高度, 该条件保持 71 h 后, 以相同速度在 30 min 后下降至正常海拔高度, 恢复常压常氧。小鼠在舱内自由饮食, 光照明暗各 12 h, 造模结束后立即开展评价 (图 2)。

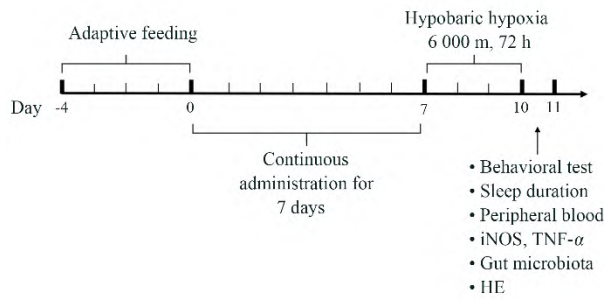


Figure 2 The illustration scheme of the pharmacodynamics evaluation. TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; HE: Hematoxylin-eosin staining

血细胞计数检测 小鼠出舱后，立即尾静脉取血，用手术刀片快速划破小鼠尾部静脉，用尾静脉采血管迅速吸取 20 μL 注入备好的血细胞稀释液中，吹打均匀，使血液均匀分散在稀释液中，避免出现凝血现象。使用全自动血细胞分析仪检测小鼠血液中白细胞 (white blood cell, WBC)、红细胞 (red blood cell, RBC)、血红蛋白 (hemoglobin, HGB) 和红细胞压积 (hematocrit, HCT) 水平。

睡眠持续时间评价 小鼠腹腔注射 1% (w/v) 戊巴比妥钠溶液 (50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)，观察小鼠是否出现睡眠现象，记录药物注射时间、睡眠潜伏时间与睡眠持续时间，比较各组睡眠时长的差异。

行为学实验 旷场实验可评价小鼠自主探索能力，将小鼠置于旷场实验箱中心点位置，记录小鼠自由活动 5 min 内轨迹，对小鼠活动总路程、活动时长等进行记录，统计并进行分析。新物体识别测试可检测短期记忆能力，在实验箱内放置两个相同物体，小鼠自由活动 10 min，使其熟悉两个物体，间隔 1 h 后，将其中一个物体换成新物体，让小鼠自由活动 5 min。利用视频分析系统记录小鼠测试期内识别新物体的次数，并计算识别指数：

$$\text{识别指数} = \frac{\text{识别新物体的次数}}{(\text{识别新物体的次数} + \text{识别旧物体的次数})}$$

iNOS、TNF- α 水平检测 小鼠摘眼球取血，血样 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜，于 3 500 \times g 转速下离心 15 min 后取上清，按照试剂盒说明书检测 iNOS、TNF- α 含量。

肠道内容物收集与 16S rRNA 高通量测序 造模结束后，正常组、模型组、合生制剂组各取 3 只小鼠小心且快速将肠道内容物取出，放入无菌冻存管置于液氮中保存，全部采集结束后转移至 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，进行肠道菌群 16S rRNA 高

通量测序实验。

肠道组织病理切片 解剖取出距胃部下端 5 cm 处的长度为 1 cm 的小肠组织, 生理盐水冲洗, 于中性福尔马林溶液中固定, 进行脱水、石蜡包埋、切片处理, 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色后在显微镜下观察组织病理形态, 并拍照。

数据分析 以上数据均以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 19.0 软件通过单因素方差分析进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 表示有统计意义。

结果

1 LBP 促进 LGG 生长

以 LGG 数 ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 值作图, 绘制标准曲线 (图 3A)。LGG 在 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 值 0.25~1.25 内线性方程为 $y = 178\ 692\ 637 x + 35\ 235\ 207$ ($r = 0.995\ 6$), 线性关系良好, 可用于定量检测。

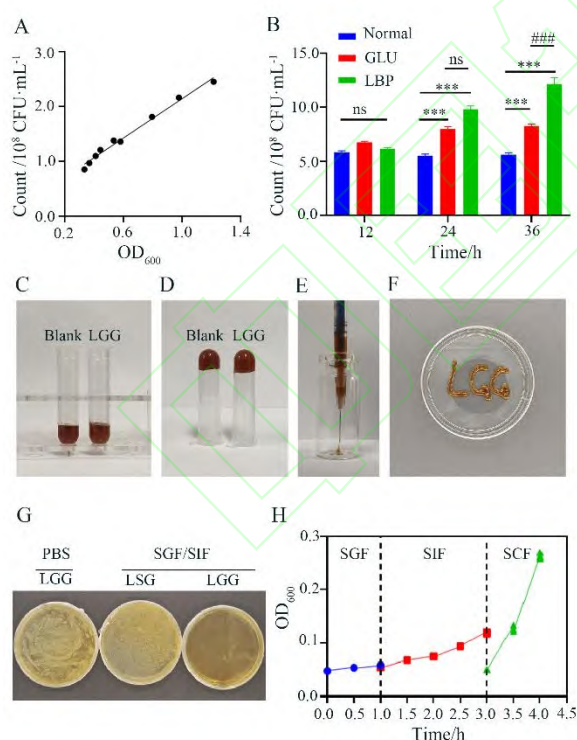


Figure 3 Characteristics of symbiotics. A: Standard curve of *Lactobacillus rhamnosus* (LGG); B: Counting of LGG in different medium; C, D: Gelatinization; E, F: Injectability; G, H: Plate colony growth and OD values of symbiotics at 600 nm in SGF, SIF and SCF. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$; ### $P < 0.001$. GLU: Glucose; LBP: *Lycium barbarum* polysaccharide; LSG: LGG @ sodium alginate gel; SGF: Simulated gastric

fluid; SIF: Simulated intestine fluids; SCF: Simulated colon fluids; OD: optical density

厌氧培养后, LGG 在无碳源培养基中 36 h 生长状况无明显变化, 2% GLU 培养基和 2% LBP 培养基内 LGG 生长状态较好。GLU 作为阳性对照, 对 LGG 的生长具有促进作用, 说明糖类可以促进 LGG 的生长繁殖。LBP 对 LGG 的生长具有明显的促进作用, 其在 12 h 后的生长速度远远高于无碳源培养基组和 GLU 组, 且在 36 h 内持续生长 (图 3B)。LBP 可在体外促进有益菌的生长, 是良好的益生元。

2 SA 凝胶的成胶性及可注射性

将 CaCl_2 溶液滴入 SA 溶液, CaCl_2 中的 Ca^{2+} 会与 SA 中的 Na^+ 产生离子交换, Ca^{2+} 与 SA 分子中的羧基发生交联反应, 生成凝胶。本研究制备的凝胶其外观如图 3C 所示, 可以长时间倒置且不向下流动 (图 3D), 形成凝胶。凝胶可注射, 可以在培养皿中写出“LGG”字样, 表明 SA 凝胶具有良好的可注射性 (图 E、F)。以上结果表明, SA 凝胶适合注射使用, 有较好的可注射性, 以便后续动物实验进行灌胃给药。

3 SA 凝胶合生制剂的胃肠道环境耐受性

根据平板菌落生长情况 (图 3G), 未包裹 SA 凝胶的 LGG 经过 SGF 和 SIF 孵育后, 在培养板上培养 24 h 后没有长出菌落, 表明 LGG 可能被胃酸杀死, 菌株活性下降, 难以生长繁殖。而 LSG 经过 SGF 和 SIF 连续孵育, 培养 24 h 后仍有大量活菌能生长繁殖, 表明 SA 凝胶可有效保护 LGG 不受胃肠道破坏。

4 SA 凝胶合生制剂体外释放

SA 凝胶具有良好的耐胃酸性。LSG 置于 pH 1.2 的 SGF 中 1 h 后, 几乎没有 LGG 释放。将它们转移至 pH 6.6 的 SIF 中 2 h 后, LGG 得到释放。此外, 当它们被转移到 pH 7.8 的 SCF 中时, LGG 释放量较大 (图 3H)。表明 LGG 在胃酸中得到了较好的保护, 能够靶向到肠道环境进行释放。

5 SA 凝胶合生制剂微观形貌

扫描电镜是在微观水平上研究凝胶结构最常用的技术。本研究中, SA 与 Ca^{2+} 反应具有良好的胶凝特性, 制备的益生元凝胶具有松散的孔隙结构, 能有效负载 LGG, 有助于 LGG 在其中生长繁殖 (图 4A)。通过扫描电镜观察 SA 凝胶载 LGG 的形貌 (图 4B), 红色箭头指示 LGG, 有杆状益生菌, SA 凝胶可较好负载 LGG。

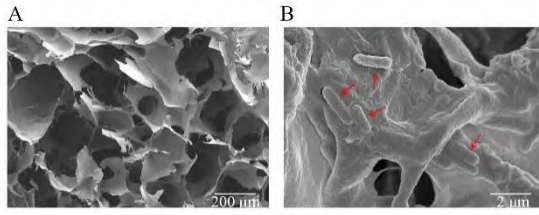


Figure 4 Scanning electron microscope images. A: Blank, scale bars, 200 μm ; B: Symbiotics, scale bars, 2 μm

6 合生制剂延长睡眠持续时间

在本研究中，与正常组相比，模型组小鼠睡眠时长显著缩短 ($P < 0.001$)，易清醒，证明高原睡眠障碍模型建立成功 (图 5A)。与模型组相比，给药组小鼠睡眠状况均有改善，睡眠时间延长，尤其乙酰唑胺组 ($P < 0.001$) 和合生制剂组 ($P < 0.001$) 小鼠的睡眠时长显著增加。上述结果证明，合生制剂组可以改善高原睡眠障碍，延长模型小鼠的持续睡眠时长，并且改善效果优于单一的 LBP 组和 LGG 组，说明合生制剂可以改善小鼠的高原睡眠障碍。

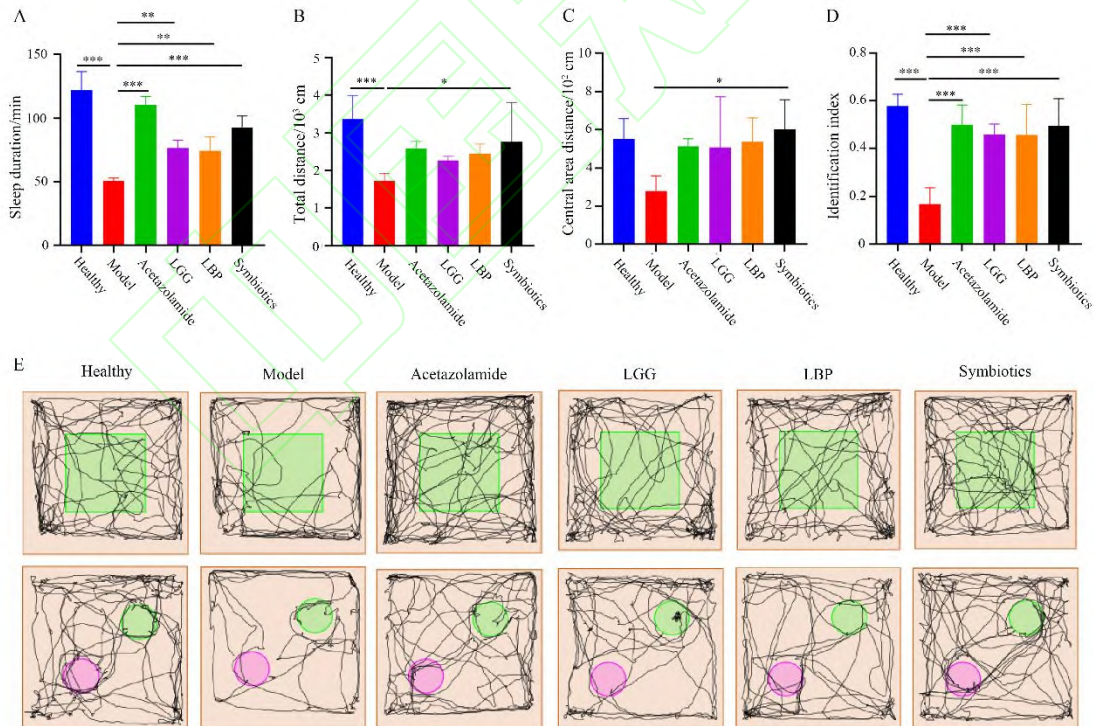


Figure 5 Sleep duration, exploratory behavior and short-term memory of mice were evaluated. A: The sleep duration; B: The total distance; C: The central area distance; D: The identification index of novel objects recognition test; E: The tracks of movement.

$n = 5, \bar{x} \pm s. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001$

7 合生制剂改善小鼠探索能力和短期记忆能力

利用旷场实验记录小鼠的自由活动轨迹,可以反映小鼠的自主探索能力。低压缺氧模型组小鼠的活跃程度不如正常组,旷场活动的总路程显著减少(图 5B, $P < 0.001$),小鼠更倾向于在旷场周边活动,中心区域活动距离较少(图 5C),显示低氧环境会导致小鼠自主探索能力降低。合生制剂给药后,小鼠活动距离显著改善($P < 0.05$),说明合生制剂可以增强小鼠的自主探索能力。新物体识别实验可以评估小鼠的短期学习记忆能力。本研究中模型组小鼠的识别指数较低(图 5D, $P < 0.001$),证明低压缺氧会导致小鼠的学习记忆能力下降。与模型组相比,给药组识别指数显著增大(图 5D),倾向于探索新物体(图 5E),说明学习记忆能力显著升高,且合生制剂组改善效果最佳($P < 0.001$)。上述结果证明,合生制剂可以提高小鼠的自主探索能力和短期记忆能力。

8 合生制剂改善小鼠血细胞水平

采用血细胞分析仪分析各组小鼠血象变化。WBC 与炎症反应密切相关,RBC、HCT、HGB 可综合反映血液的携氧能力,低氧条件下 RBC、HCT、HGB 会出现代偿性升高,因此本研究选择以 WBC、RBC、HGB、HCT 为主要检测指标。与正常组相比,低压缺氧环境下模型组小鼠的 WBC ($P < 0.001$)、RBC ($P < 0.001$)、HGB ($P < 0.001$)、HCT ($P < 0.001$) 均有显著升高(图 6A~D),说明模型组小鼠在缺氧条件下,可能发生了炎症反应及代偿反应。给药后,合生制剂能显著降低机体 WBC 水平(图 6A, $P < 0.001$),对 RBC ($P < 0.01$)、HGB ($P < 0.01$) 及 HGB ($P < 0.05$) 的代偿性升高也有一定的缓解作用(图 6B~D)。该合生制剂能促进低氧条件下小鼠血细胞恢复到正常水平。

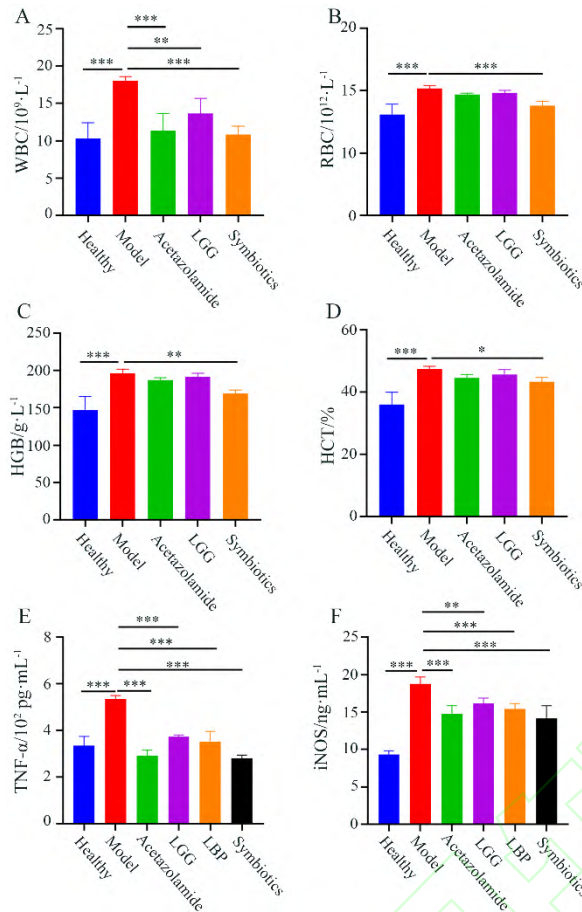


Figure 6 Peripheral blood cells and cytokines including TNF- α and iNOS. A–D: Peripheral blood cells including WBC, RBC, HGB and HCT; E: The content of TNF- α ; F: The content of iNOS. $n = 5, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. WBC: White blood cell; RBC: Red blood cell; HGB: Hemoglobin; HCT: Hematocrit

9 合生制剂降低 iNOS、TNF- α 水平

iNOS 可能是高原睡眠障碍的致病机制之一，TNF- α 可能与缺氧引起的炎症损伤有关。缺氧条件下，模型组小鼠的 iNOS 和 TNF- α 表达升高 ($P < 0.001$)。给药后各组小鼠 iNOS 和 TNF- α 水平显著降低，且合生制剂组 ($P < 0.001$) 效果最佳，表明合生制剂可以缓解机体缺氧损伤 (图 6E、F)。

10 合生制剂调节肠道菌群

肠道菌群的相对丰度与菌株丰富度与人的健康息息相关。高原缺氧改变了肠道微生物群的门和属水平，肠道拟杆菌门丰度升高，厚壁菌门丰度降低 (图 7A)，乳杆菌属丰度明显降低 (图 7B)。合生制剂预防给药后，肠道菌群丰度得到改善，厚壁菌门增加，拟杆菌门丰度降低，趋于正常水平 (图 7A)。在属水平

上, 相较正常组, 模型组乳杆菌属丰度明显降低, 合生制剂组可以改善肠道内乳杆菌属水平, 使其恢复到正常水平 (图 7B、C, $P < 0.05$)。Chao 指数 (图 7D)、Shannon 指数 (图 7E) 和 Venn 图 (图 7F) 表明模型组小鼠肠道微生物群落的丰度和多样性显著低于正常组。与模型组相比, 合生制剂可增加小鼠肠道菌群的丰富度和多样性, 明显升高肠道益生菌乳杆菌属的相对丰度, 具有调节肠道菌群, 保护肠道菌群多样性的作用。

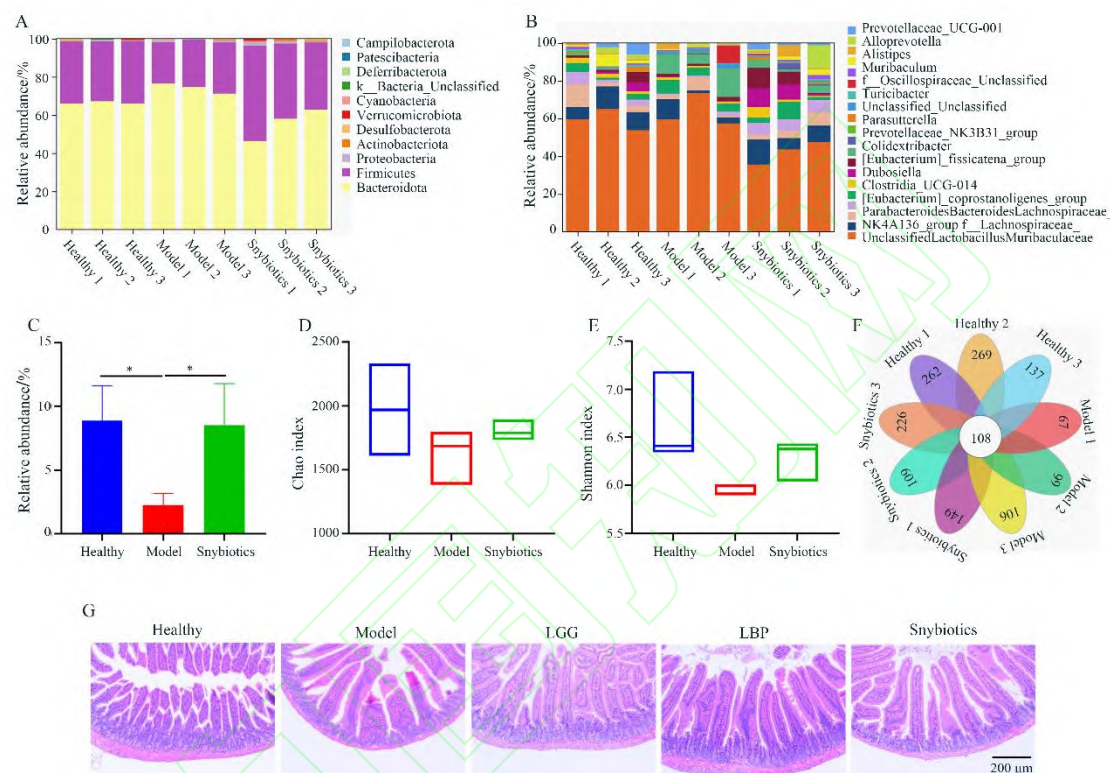


Figure 7 Regulation of gut microbiota and colon pathological by symbiotic. A: The changes of abundance and diversity of gut microbiota at the phylum level; B: The changes of abundance and diversity of gut microbiota at the genus level; C: Probiotic abundance; D: Chao index; E: Shannon index; F: Venn diagram; G: Pathological changes in the small intestine. Scale bars, 200 μm . $n = 3$, $\bar{x} \pm s$, $*P < 0.05$

11 合生制剂减轻小肠组织损伤

益生菌可用于治疗神经性疾病作用方式包括调节免疫系统、产生短链脂肪酸或支持肠道屏障完整性^[31]。健康的肠道环境是由肠道微生物群对大脑进行调节的基础, 肠道上皮细胞和肠黏膜在肠-脑轴中发挥重要作用。小肠病理切片可显示肠道结构和屏障的完整性。小肠组织 HE 染色结果表明 (图 7G), 缺氧条件下

模型组小肠组织的肠壁变薄, 小肠隐窝变形, 排列松散, 有明显的炎症浸润。合生制剂改善了肠道环境, 修复了小肠损伤, 合生制剂组小鼠的小肠隐窝与健康小鼠更接近, 炎症浸润减少。

讨论

高原低压、低氧、辐射强、温度低等特殊环境对高原作业人员的健康及体能都带来极大的影响。高原睡眠障碍主要是高海拔地区的特殊环境因素导致的人体睡眠质量下降或失眠等问题的状况, 其发生发展机制非常复杂, 包括缺氧导致的 CO_2 分压下降、一氧化氮分泌减少、大脑神经递质释放水平降低、昼夜节律基因表达改变等^[32,33]。长期低质量的睡眠状态, 会对人类神经系统造成损伤, 降低大脑灵敏度、记忆力和分析能力^[34]; 增加心理压力出现焦虑、抑郁等不良情绪, 加重睡眠障碍, 形成恶性循环^[8]; 也会对消化系统产生损害, 导致胃肠功能紊乱^[35]。高原睡眠障碍常用的干预手段主要有物理干预(生活方式干预、音乐疗法等)及药物治疗。乙酰唑胺是美国食品药品监督管理局批准的唯一针对急性高原病的药物, 但不良反应较多, 包括多尿、头痛、恶心、疲劳等^[9]。因此, 寻找有效的高原睡眠障碍意义重大。

高原环境可影响肠道菌群的丰度, 肠道菌群不仅可以影响胃肠功能, 还可以通过神经、代谢等通路调节中枢神经系统活动, 菌群失调可以导致睡眠障碍^[36]。因此, 肠道菌群可能是防治高原睡眠障碍的一个重要靶点。本课题组前期研究发现, 高原睡眠障碍模型动物体内肠道乳杆菌属的丰度明显降低^[23], 在此基础上, 本研究以肠道菌群作为治疗靶点, 通过体内补充 LGG、调节肠道菌群丰度改善小鼠的高原睡眠障碍。

LBP 是一种新型益生元, 可以为益生菌提供营养来源, 促进其生长繁殖。本研究通过比较不同培养基对 LGG 促生作用的影响, 验证了 LBP 具有较好的促益生菌生长的作用。水凝胶柔软、含水量高, 具有良好的生物相容性和生物可降解等特性, 是一种具有优良性能的生物材料, 在生物工程领域、药物输送领域具有重要的作用。SA 是一种天然多糖, 是常用于制备水凝胶的高分子材料, 具有稳定性、黏膜黏附性、凝胶性和生物安全性; 同时具有明显的生物活性。SA 与 CaCl_2 交联可生成具有均匀松散的孔隙结构, 可以良好的负载 LGG 的凝胶。用 SA 凝胶包载 LGG 的合生制剂, 具有良好成胶性和可注射性, SA 作为益生元可耐受胃酸、消化酶, 制备成凝胶后, 通过耐胃酸实验及体外消化液释放模拟实验验证,

SA 凝胶能保护益生菌不受胃酸环境的破坏,提高益生菌存活率,用于益生菌的口服递送,为后续体内药效评价奠定了基础。

进入高原后,血细胞缺氧会刺激低氧诱导因子表达增加,增加下游红细胞生成素的合成和分泌,促进红细胞生成增加,这是机体在低氧环境下的代偿性反应,有利于改善组织供氧。但是红细胞过度增加和累积,可增加血液的黏滞性,影响血流速度,加重组织缺氧甚至导致高原疾病的发生^[37]。正常情况下血液测量范围为 WBC: $2.6\sim 13\times 10^9/L$, RBC: $6\sim 12.5\times 10^{12}/L$, HGB: $100\sim 190\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, HCT: $40\%\sim 48\%$ 。本实验中血细胞水平检测显示,预防给药合生制剂 7 天可使机体缺氧程度减轻,维持小鼠血细胞趋于正常水平,且与阳性对照药乙酰唑胺的药效相当。iNOS 和 TNF- α 可能是高原睡眠障碍的致病机制之一。TNF- α 是一种炎症因子,暴露在缺氧环境下会增加多种炎症因子的产生,炎症因子可以减少促睡眠细胞因子,产生抗睡眠作用^[38,39]。一氧化氮由一氧化氮合酶催化,能通过增加脑血流量来改善氧气的输送,iNOS 是一氧化氮合酶的三种亚型之一。本实验以 iNOS 为评价指标,当机体缺氧时,iNOS 表达增加^[40]。口服合生制剂后,小鼠 iNOS 表达明显低于模型组,说明机体缺氧反应明显缓解,体内氧含量不足以触发 iNOS 响应机制。

肠道微生物作为肠道环境的重要参与者,直接刺激肠壁细胞活性因子的分泌,且肠道微生物产生的短链脂肪酸对大脑的调节有着重要意义^[41,42]。本课题组前期研究发现^[23],高原低氧在门和属水平上改变了主要肠道菌群的相对丰度,乳酸杆菌丰度明显降低,短链脂肪酸产生代谢减少。结合本实验结果,模型组小鼠肠道菌群丰度明显降低,通过预防给予本合生制剂,可增加小鼠肠道菌群丰度和多样性,具有保护肠道菌群多样性的作用。而且该合生制剂可修复高原低氧导致的小肠结构损伤,并降低了炎症浸润现象,为肠道菌群提供趋于健康的肠道环境,同时对睡眠相关指标有明显改善。因此合生制剂可能通过改善肠道环境、调节肠道微生物群、维护肠道组织结构完整来预防高原睡眠障碍。

综上,本研究以肠道菌群作为治疗靶点,制备了 LGG-LBP 合生制剂,通过调节肠道菌群,改善肠道微生物丰度,预防高原环境导致的睡眠障碍,有望成为预防原睡眠障碍的有效口服制剂。

作者贡献: 牛红负责实验操作、数据处理及论文初稿撰写;吴艳萍负责实验

操作; 杜丽娜、金义光负责课题设计、实验指导、数据分析、文章写作与修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Patrician A, Anholm JD, Ainslie PN. A narrative review of periodic breathing during sleep at high altitude: from acclimatizing lowlanders to adapted highlanders [J]. *J Physiol*, 2024, 602: 5435-5448.
- [2] Tan LX, Li Y, Chen HX, et al. Sleep at high altitude: a bibliometric study and visualization analysis from 1992 to 2022 [J]. *Heliyon*, 2024, 10: e23041.
- [3] Ibrahim A, Stefani A, Cesari M, et al. Effects of periodic breathing on sleep at high altitude: a randomized, placebo-controlled, crossover study using inspiratory CO₂ [J]. *J Physiol*, 2024, 602: 5549-5568.
- [4] Wu Y, Zhou SM, Li YL, et al. Remote ischemic preconditioning improves spatial memory and sleep of young males during acute high-altitude exposure [J]. *Travel Med Infect Dis*, 2023, 53: 102576.
- [5] Wang HH, Li XY, Li JH, et al. Sleep, short-term memory, and mood states of volunteers with increasing altitude [J]. *Front Psychiatry*, 2022, 13: 952399.
- [6] Wang CQ, Huang X, Tang ZY, et al. Dissolving microneedles loaded with nimodipine for prevention of sleep disorders at a high altitude [J]. *Pharm Dev Technol*, 2024, 29: 415-428.
- [7] Chen X, Zhang JX, Lin Y, et al. Mechanism, prevention and treatment of cognitive impairment caused by high altitude exposure [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1191058.
- [8] Jin Y, Li JQ, Ye J, et al. Mapping associations between anxiety and sleep problems among outpatients in high-altitude areas: a network analysis [J]. *BMC Psychiatry*, 2023, 23: 341.
- [9] Wright A, Brearey S, Imray C. High hopes at high altitudes: pharmacotherapy for acute mountain sickness and high-altitude cerebral and pulmonary oedema [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2008, 9: 119-127.
- [10] Liu MY, Zhao CY, Shang NY, et al. Non clinical pharmacodynamic evaluation system of high-altitude hypoxic brain injury [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023,

58: 1515-1520.

- [11] Caldarelli M, Rio P, Marrone A, et al. Gut-brain axis: focus on sex differences in neuroinflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25: 5377.
- [12] Wang Q, Zhao YX, Zhao HL, et al. Research progress of gut microbiota in the antidepressant effect of traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 2022, 57: 3494-3501.
- [13] Mayer EA, Nance K, Chen S. The gut-brain axis [J]. *Annu Rev Med*, 2022, 73: 439-453.
- [14] Osadchiy V, Martin CR, Mayer EA. The gut-brain axis and the microbiome: mechanisms and clinical implications [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17: 322-332.
- [15] Martin CR, Osadchiy V, Kalani A, et al. The brain-gut-microbiome axis [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 6: 133-148.
- [16] Wang Z, Wang Z, Lu TS, et al. The microbiota-gut-brain axis in sleep disorders [J]. *Sleep Med Rev*, 2022, 65: 101691.
- [17] Wang Z, Chen WH, Li SX, et al. Gut microbiota modulates the inflammatory response and cognitive impairment induced by sleep deprivation [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26: 6277-6292.
- [18] Agrawal R, Ajami NJ, Malhotra S, et al. Habitual sleep duration and the colonic mucosa-associated gut microbiota in humans-a pilot study [J]. *Clocks Sleep*, 2021, 3: 387-397.
- [19] Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16: 605-616.
- [20] Socała K, Doboszevska U, Szopa A, et al. The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and neurological disorders [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 172: 105840.
- [21] Liu GQ, Bai X, Duan YB, et al. Changes in the intestinal flora of rats under high altitude hypoxia [J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 2021, 56: 1100-1108.
- [22] Bai X, Liu GQ, Ynag JX, et al. The effect of high-altitude hypoxia on drug

- metabolism is mediated by gut microbiota [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2021, 56: 2787-2796.
- [23] Wu YP, Tang ZY, Du SM, et al. Oral quercetin nanoparticles in hydrogel microspheres alleviate high-altitude sleep disturbance based on the gut-brain axis [J]. *Int J Pharm*, 2024, 658: 124225.
- [24] Segers ME, Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG--host interactions [J]. *Microb Cell Fact*, 2014, 13 (Suppl 1): S7.
- [25] Zhou WJ, Chi JW, Yi Y, et al. Physicochemical properties and synergistic prebiotic activities of polysaccharides from Longan fruits, Goji berries, and Jujube fruits [J]. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2021, 37: 58-67.
- [26] Yan A, Ding HK, Liu JJ, et al. Black *Lycium barbarum* polysaccharide attenuates LPS-induced intestine damage *via* regulation gut microbiota [J]. *Front Microbiol*, 2023, 13: 1080922.
- [27] Lai WJ, Wang CY, Lai RF, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide modulates gut microbiota to alleviate rheumatoid arthritis in a rat model [J]. *NPJ Sci Food*, 2022, 6: 34.
- [28] Guan TY, Ren YL, Guan QL, et al. Study on the function of *Lycium barbarum* polysaccharide in regulating human gut microbiota *in vitro* [J]. *J Food Sci Biotechnol* (食品与生物技术学报), 2023, 42: 74-81.
- [29] Michels M, Jesus GFA, Abatti MR, et al. Effects of different probiotic strains *B. lactis*, *L. rhamnosus* and *L. reuteri* on brain-intestinal axis immunomodulation in an endotoxin-induced inflammation [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59: 5168-5178.
- [30] Cui F, Shi CL, Zhou XJ, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide extracted from *Lycium barbarum* leaves ameliorates asthma in mice by reducing inflammation and modulating gut microbiota [J]. *J Med Food*, 2020, 23: 699-710.
- [31] Góralczyk-Bińkowska A, Szmajda-Krygier D, Kozłowska E. The microbiota-gut-brain axis in psychiatric disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 11245.
- [32] Tian LS, Yao YD, Zhou W, et al. Advances in the prevention and treatment of sleep disorder among military personnel at high altitude [J]. *Mil Med Sci* (军事医学), 2020, 44: 546-551, 558.

- [33] Wang CQ, Jiao WC, Du LN. Mechanism, preventive and therapeutic drugs for sleep disorders in plateau [J]. Herald Med (医药导报), 2022, 41: 1816-1821.
- [34] Li BQ, Dong HT, Wang YX, et al. Effects of sleep insufficiency on spatial working memory in low-pressure and hypoxic environments [J]. Medicine (Baltimore), 2022, 101: e30210.
- [35] Issa AN, Herman NM, Wentz RJ, et al. Association of cognitive performance with time at altitude, sleep quality, and acute mountain sickness symptoms [J]. Wilderness Environ Med, 2016, 27: 371-378.
- [36] Matenchuk BA, Mandhane PJ, Kozyrskyj AL. Sleep, circadian rhythm, and gut microbiota [J]. Sleep Med Rev, 2020, 53: 101340.
- [37] Dunn JF, Isaacs AM. The impact of hypoxia on blood-brain, blood-CSF, and CSF-brain barriers [J]. J Appl Physiol (1985), 2021, 131: 977-985.
- [38] Eltzhig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation [J]. N Engl J Med, 2011, 364: 656-665.
- [39] Lemos Vde A, dos Santos RV, Lira FS, et al. Can high altitude influence cytokines and sleep? [J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 279365.
- [40] Terraneo L, Samaja M. Comparative response of brain to chronic hypoxia and hyperoxia [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18: 1914.
- [41] Li YY, Hao YL, Fan F, et al. The role of microbiome in insomnia, circadian disturbance and depression [J]. Front Psychiatry, 2018, 9: 669.
- [42] Dou CH, Liu YR, Fu LR, et al. Effect of Hewei Anshen prescription on sleep disorders and its influence on intestinal flora and neurotransmitter levels [J]. Tradit Chin Med Res (中医研究), 2024, 37: 33-36.