

第二十二屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA22-371

姓名：吳律寬

作品名稱：探討生理時鐘對腸道菌和小鼠行為模式
的影響

參賽類別：生物

關鍵字：生理時鐘、腸道菌、行為模式

摘要

本研究探討小鼠生理時鐘混亂對四種行為及腸道菌相的影響。我們取六隻同品系小鼠，以4小時黑暗光照交替混亂其生理週期，並與12小時週期作為對照組。分別在2.5及4個月後，收集及抽取糞便中腸道菌DNA，利用次世代定序鑑定腸道菌的種類。並測定記憶力、肌耐力、空間焦慮、光線焦慮四種行為變化。最後將行為結果與腸道菌相變化進行關聯性分析，探討生理時鐘混亂和腸道菌相及行為的關連性。

和對照組相比對，我們研究結果顯示生理時鐘混亂後會造成小鼠空間焦慮顯著上升，而記憶力、肌耐力也有變弱的趨勢。接著，我們以T test、散布圖與支序圖分析，發現六種有顯著變化的菌屬。最後經過相關性分析後，我們發現有兩種菌屬RF39、Muribaculaceae與焦慮行為展現有中度相關。最後，我們有進行生理時鐘混亂2.5及4個月菌屬相對含量的差異性比較，可以看出生理時鐘混亂持續的時間長度對於菌屬含量也會隨之變動。我們依據實驗及關連性分析結果，推測出以下可能模型，前人發現生理時鐘改變會會影響行為展現，另外，腸道菌相的不同變化也會有不同的行為表現，我們的關聯性研究分析結果指出生理時鐘混亂造成行為模式改變有可能透過腸道菌相間接影響。

壹、前言

一、研究動機

現代生活中人們生活壓力大導致作息混亂。學生忙碌的學習生活、經常性的熬夜，天天加班的上班族，甚至晝夜顛倒的大夜班工作都會造成睡眠周期的不穩定。生活作息變化大對人體造成了許多影響如：生理週期紊亂、記憶力下降、焦慮、易怒等(Vincent et al.,2022)。腸道被稱為第二大腦，擁有一套獨立自主的腸道神經系統(ENS, enteric nervous system)，腸道內的微生物生態系，研究指出可以左右一個人的情緒，腦腸軸影響腦部神經系統及行為表現(lu lui, 2018)。而生理時鐘混亂是否透過改變腸道菌相間接影響腦腸軸，進而影響行為展現，並未被深入探討。因此我們透過改變小鼠生理時鐘來觀察小鼠行為模式的轉變以及與腸道菌相的變化，試圖找出生理時鐘轉變和腦腸軸的相關性。

二、研究背景

(一)現代人生理作息普遍混亂：

現在人們普遍生活作息混亂，導致失智症、帕金森氏症、躁鬱症確診的人數越來越多，造成醫療健保及社會極大的壓力，所以我想從根本了解原因，探討生理時鐘對於行為模式的關聯性及其中可能的機制。

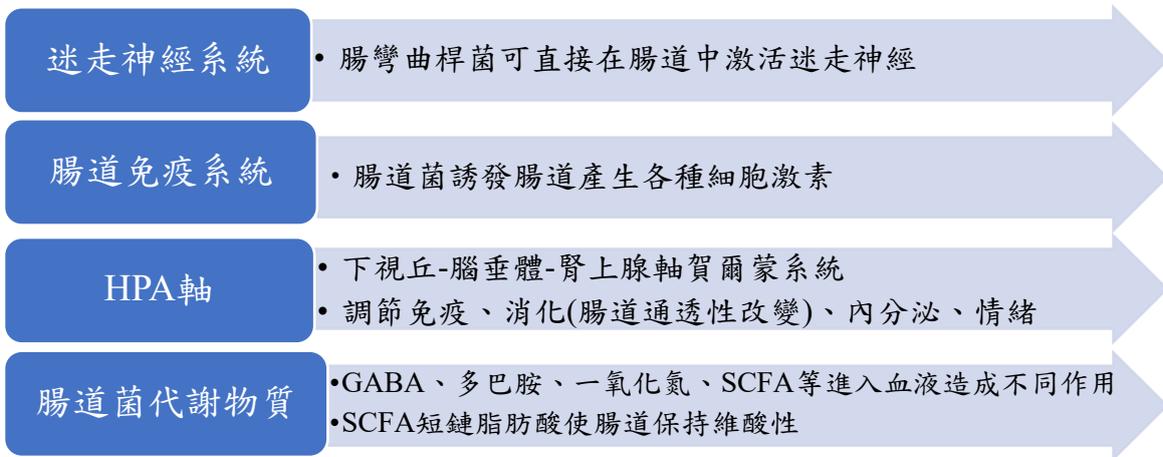
(二)生理時鐘理論：

目前已有文獻發現生理時鐘受器：光敏視網膜神經節細胞 (intrinsically photosensitive retinal ganglion cell, ipRGC) 此光受器細胞接受光線刺激後，經由傳送至視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN)的生理時鐘中樞，進而調節動物的情緒、學習、壓力甚至導致動物行為模式改變(Cameron L. Prigge et al.,2016)

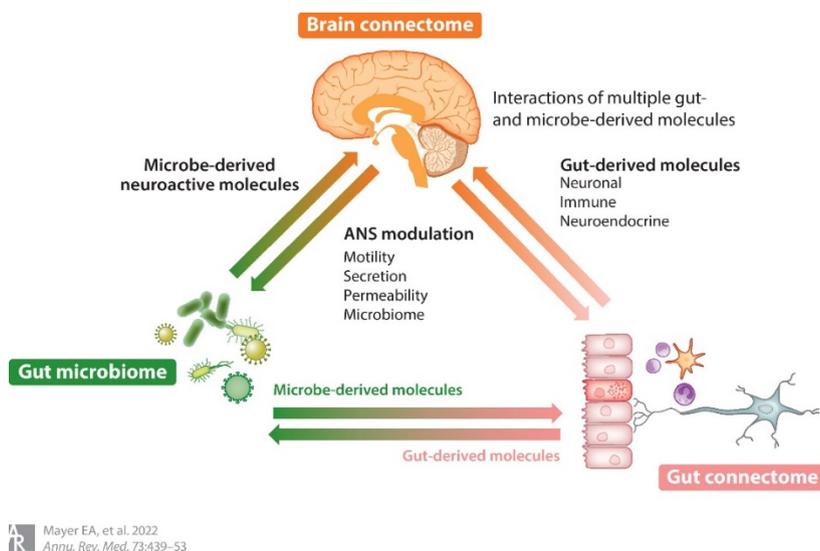
(三)腦腸軸發現：

腸－腦軸線 (gut-brain axis) 是腸道與大腦溝通的雙向聯繫管道，腸道內有數百萬神經元，因此有人體「第二大腦」的暱稱，科學家發現腸道中的腸道菌會直接或間接透過代謝產物如短鏈脂肪酸由腸道吸收穿過血腦屏障，調節大腦正常發育，影響中樞神經、自主神經或是免疫系統影響行為或情緒(Marilia carabotti,2015)。詳細機轉過程整理如圖一，另外也有研究指出某特定菌相與嬰兒的非社交恐懼有關(Alexander, L.Carlson. et al.,2021)，生理時鐘改變是否透過特定腸道菌影響行為展現並沒有被探討過。所以我們

想透過改變光照週期去影響生理時鐘，探討生理時鐘混亂後對行為改變的影響，以及腸道菌相的變化情形，試圖找出生理時鐘改變對行為及腸道菌相的關聯性。



圖一：腸道菌影響人體的各種途徑(作者自繪)



Mayer EA, et al. 2022
Annu. Rev. Med. 73:439-53

圖二：腦腸軸關係示意圖(取自Emeran a. mayer. et al.,2022)，圖中顯示腸道菌可以透過腸道本身和腸道菌代謝物共同作用影響腦部神經系統的作用

(四)短鏈脂肪酸(Short-chain fatty acid，簡稱SCFA)功用：

腸道菌可將食物中的纖維消化成短鏈脂肪酸SCFA，SCFA不隻可以增加腸道健康程度，抑制壞菌，也可以被腸壁吸收後，透過血液運送至各器官產生影響，譬如抑制組蛋白脫乙酰酶 (histone deacetylase, HDAC) 活性，藉由增加染色體致密性而阻斷某些抑癌基因的表現。已有多研究證實短鏈脂肪酸與多種神經疾病有關連性(Silva, Y. P. et al.,2020)，最新研究指出SCFA可緩解小鼠的認知和空間記憶障礙，亦可以減少 A β 沉積和 tau 蛋白異常磷酸化，促進星狀膠細胞與神經元代謝，減少神經元氧化損傷(Yan sun. et al.,2023)。

三、研究目的

- (一)觀察生理時鐘混亂對小鼠行為的影響。
- (二)分析生理時鐘改變對腸道菌相的影響。
- (三)探討腸道菌相和行為改變的關聯性。

貳、研究材料及方法

一、研究材料

(一)、實驗動物：

我們以哺乳動物為實驗對象，因其神經系統與人類極為類似，常用於人類行為生理的實驗動物。小家鼠 (*Mus musculus*) 在許多哺乳動物生理時鐘實驗中常為實驗對象，本實驗稱之為小鼠。小鼠易飼養，且容易操作生理時鐘，在生育和取得方面也較容易。因此我們選用6隻同品種小鼠 (品種編號為C57BL/6J)來進行實驗。取得小鼠後經過PCR後以電泳測定其基因型，確定為純品系，才利用長時間的光照周期來進行生理時鐘調控。

實驗動物由大學實驗室提供(親代為小鼠交配後選出野生型純品種(wild type，童原染色體上均有目標基因則表示為WT/WT)，小鼠生於2021年8月26日。我們將小鼠置入飼養籠，放入以定時器設定好光照週期的櫃子中，定期補充飼料和水，在籠子聯時定期更換飼養籠以確保小鼠維持健康狀態。飼養至第三週時將小鼠分籠飼養，飼養到兩個月大時開始利用光照週期調控小鼠的生理時鐘，實驗過程中小鼠可以隨意獲取食物和水。所有程序均按照動物法規並經研究機構動物護理和使用委員會批准(許可證號：110-058)。

(二)、研究藥品

表一、研究藥品列表

研究方法	使用藥品
小鼠品種的基因型確認 <i>Mus musculus</i> genotyping	Taq DNA Polymerase 2x Master Mix 3VF2 primer 5VF2 primer 3VR2 primer
電泳分析 electrophoresis	TAE buffer 1% Agarose gel Omics 1kb DNA Ladders Safe DNA Gel Stain
糞便腸道菌DNA萃取 Fecal DNA Extraction Protocol	ATL buffer Proteinase K AL buffer Ethanol Buffer AW1 Buffer AW2 d.d.H ₂ O
糞便腸道菌DNA純化 second PCR	DNA Binding Buffer DNA Wash Buffer Ethanol d.d.H ₂ O

二、研究方法

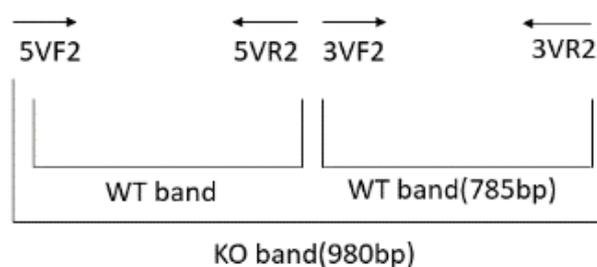
(一)、確認小鼠為單一品種

1. 剪尾取樣本：

剪下小鼠尾部約0.1cm長，將樣本加入鹼性的lysis-buffer，加熱破壞細胞以釋出小鼠的DNA，最後再加入酸性的Tris-HCl，使pH值回到中性以穩定保存小鼠染色體DNA。

2. 基因型檢測(genotyping)確認單一品種

我們取得的小鼠親代為LRRK2 Gene的異型合子個體，經雜交產生子代希望取得具有野生型同型合子LRRK2 Gene作為我們的實驗小鼠對象，此基因與帕金森氏症相關，實驗對象兩條同源染色體上的此基因皆是正常的野生型。抽取小鼠染色體DNA後，利用聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)的產物長度來判斷實驗小鼠之基因型。純品種小鼠C57BL/6J同源染色體上均具有LRRK2 Gene，因此利用專一性引子進行此基因放大並測定其片段長度。故將六隻小鼠尾巴抽取的DNA樣本，加入Taq DNA Polymerase Master Mix、primer3VR2、primer 3VF2、primer 5VF2(以兩組引子夾出此基因確認為純品種)，使用小離心機混合後加入8 well PCR Tube Strip四排，最後放入聚合酶連鎖反應儀中。圖三為此基因兩段序列雙向引子的設計圖。



圖三：PCR 使用的 LRRK2 Gene 檢測的引子設計圖，其中 primer3VR2、primer 3VF2 此對引子可夾出 785bp 長度，可檢測具有 LRRK2 Gene 的野生型(wild type，簡稱 WT) 品種，primer3VR2、primer 5VF2 此對引子可夾出 980bp 長度，若 LRRK2 Gene 基因剔除(knock out，簡稱 KO)則會出現此條帶，因此純品種 PCR 產物會有 785bp 的 WT band，不應出現 980bp 的 KO band。

3. 電泳分析

將上步驟PCR產物(10 μ L)注入1%瓊脂電泳膠(agarose)中，最後將跑完的膠體放入藍光顯相儀照相並進行PCR產物片段長度分析。

三、研究過程

(一)、生理時鐘混亂控制

小家鼠的正常生理時鐘週期為24小時，日夜交替時間長度為12小時光照、12小時黑暗 (Huang Chang-quan, 2018)。因此，我們以此週期作為生理時鐘正常的對照組(此生理時鐘正常組處理之後簡稱為T24)。生理時鐘混亂的實驗組則以光照4小時後，夜晚4小時，周期為8小時的明暗交替(生理時鐘混亂組之後簡稱為T8)。實驗組與對照組小鼠樣本個數各三隻，每一組樣本隨機分配，每組中性別有公也有母，均處以同樣飼料和生長環境下，連續生理時鐘混亂處理2.5個月及4個月，分別在此兩個時段後進行小鼠行為及腸道菌分析。表二為實驗小鼠每一個樣本資訊。

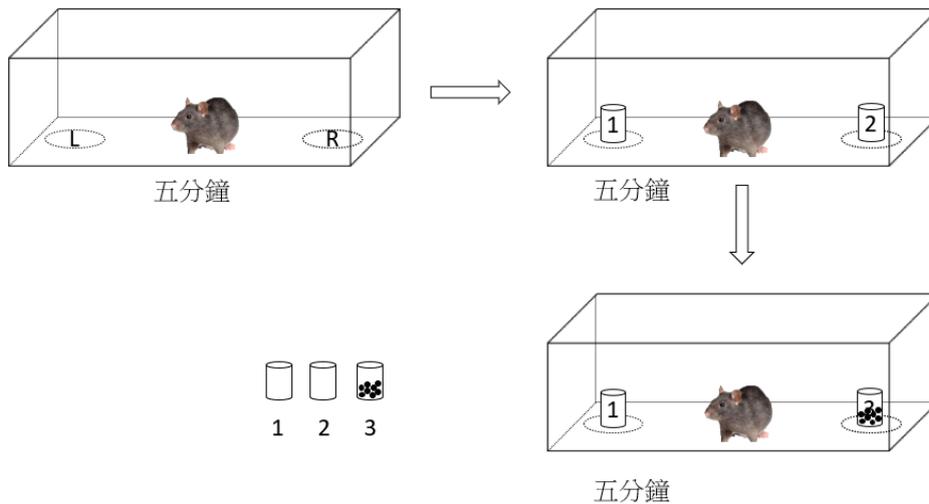
表二、研究小鼠樣本資訊

處理方式 (照光與黑暗週期 hr-小鼠編號)	樣本編號 (光暗週期長短)	小鼠性別
4hr 照光 4hr 黑暗交替-第 1 隻	T8	母
4hr 照光 4hr 黑暗交替-第 2 隻	T8	公
4hr 照光 4hr 黑暗交替-第 3 隻	T8	公
12hr 照光 12hr 黑暗交替-第 1 隻	T24	母
12hr 照光 12hr 黑暗交替-第 2 隻	T24	公
12hr 照光 12hr 黑暗交替-第 3 隻	T24	公

(二)、四種行為觀察試驗

1. Novel Object—記憶力測試(recognition memory)

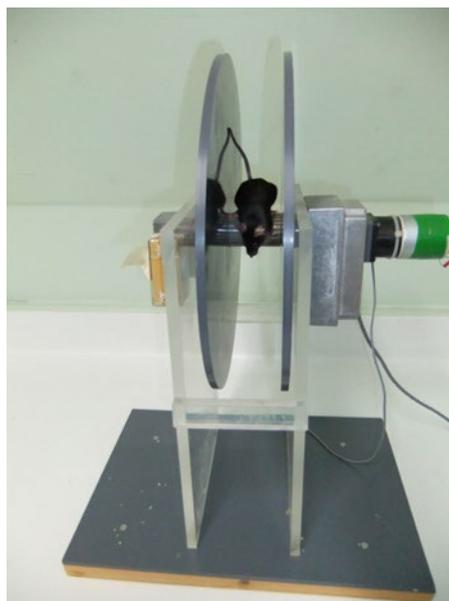
在黑邊白底的試驗箱中，底部左右畫兩個相同大小的圓做為測試區域，將試驗箱及測試物1、2先用酒精消毒乾燥後，並在測試箱上方架設攝影機錄影。將小鼠頭朝內側放入測試箱內，計時5分鐘先讓小鼠適應環境，再將物體1放入左邊(L)，物體2放入右邊(R)，計時5分鐘讓小鼠探索並記憶物體樣貌，5分鐘後將物體2換成物體3，紀錄5分鐘內小鼠探索新物體3的停留時間。進行下一次測試時均以酒精徹底消毒以免小鼠氣味互相干擾，陸續完成六隻小鼠行為測試，最後用BORIS軟體分析影片，計算出小鼠進入探索範圍的時間，比較實驗組與對照組的記憶力差異，圖四為實驗操作示意圖(作者自行繪製)。



圖四：辨識記憶行為操作圖，前五分鐘左(L)右(R)放入一樣物體(水瓶)1、2，五分鐘後將物體2置換成物體3(裝有彈珠的水瓶，圖中黑點表示彈珠，記錄小鼠探索物體3範圍所花費的時間，探索物體3花的時間越短，表示小鼠較不記得物體2，顯示記憶力較差。

2. Rotarod—測定肌耐力(協調能力)

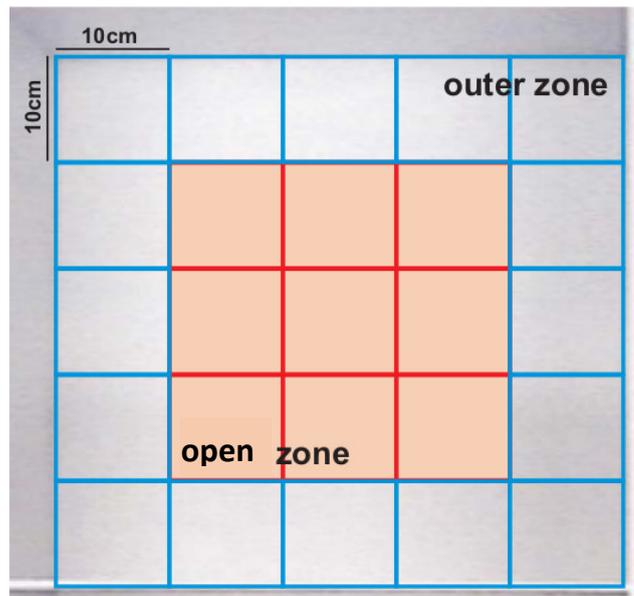
將小鼠放在滾輪上，轉速由慢至快，當小鼠掉落時記錄在滾輪上停留的時間和最後轉速(rpm/min)，每隻重複7次，計算平均值，依序完成六隻小鼠測試，過程中不可讓老鼠轉向，若老鼠沒有將注意力放在裝置上，如轉向或不移動則不記錄該次數，停留時間越長，表示肌耐力越佳，圖五為肌耐力實驗裝置示意圖。



圖五：Rotarod實驗裝置圖，讓小鼠在滾輪上跑，記錄在滾輪上面停留的秒速及其掉落當下的滾輪轉速，再轉換為肌耐力指標值。

3. Openfield—測定空間焦慮傾向

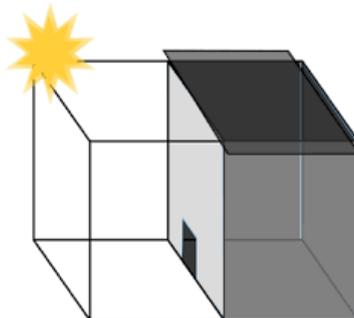
以50*50(cm²)為測試區，在上方架設錄影機，將小鼠放入測試區正中心open zone自由探索測試區10分鐘，之後將小鼠取出，用酒精將該區域消毒。最後用BORIS軟體分析影片，計算出小鼠進入中間區域30*30(cm²) open zone的時間，圖六為測試區示意圖。小鼠行為偏好在open zone活動，若進入outer zone活動，表示具有空間焦慮傾向。



圖六：Openfield 空間焦慮實驗示意圖，紀錄小鼠在中央區域的時間，本實驗數據可以反應出小鼠的空間焦慮傾向。

4. Light dark box—測定光線焦慮：

圖七為具有一個開口的黑色測試箱，左上方為光源區，在裝置上方架設錄影機，將小鼠放入開口前，頭部朝向光源，讓小鼠自由探索10分鐘，之後將小鼠取出，以酒精消毒後依序測試六隻小鼠。最後用BORIS軟體分析影片，計算出小鼠進入光源區域的時間，小鼠行為偏好在黑暗區域活動，若進入光區域，表示具有光線焦慮傾向。



圖七：Light dark box 光線焦慮實驗示意圖，箱子分為有光區域(light area)及黑暗區域(dark area)，紀錄小鼠進入light area的時間，本實驗測定小鼠對光線的焦慮。

5. 數據分析(使用繪圖統計軟體：prism 9.0)：

- (1)記憶能力數據分析：分別算出小鼠接近物體的時間並算出Index (R-L)/(R+L)，比較出更換物體前後的差異性，換物體之前：T8(AC)、T24(AC)數值做Wilcoxon Signed Rank Test，換物體之後：T8(NO)、T24(NO)數值取標準差並做T Test統計分析。
- (2)肌耐力數據分析：從7個數據中取3個中位數後平均，將混亂組T8、正常組T24做T Test統計分析。
- (3)空間焦慮數據分析：將混亂組T8、正常組T24做T Test統計分析。
- (4)光線焦慮數據分析：將混亂組T8、正常組T24做T Test統計分析。

(三)、小鼠腸道菌相分析方法

1.採集小鼠糞便樣本

在小離心管上標示好採集日期、時間、組別後放入冰桶中，取出小鼠先消毒空籠子，採取糞便時在有光時可直接採取，黑暗時為了避免外在光源干擾生理時鐘的設定，使用紅光背景進行採樣，(因小鼠無感測紅光的視錐細胞)，分別將實驗組T8組和對照組T24的6隻老鼠取出，分別放入已消毒的3個空籠，等待小鼠自然排便，若久未成功，可利用人力刺激的方式，如保定小鼠後按摩其腹部的方式促進其排便。當糞便順利排出後將其收入小離心管，完成後將小鼠放回飼養籠中，糞便樣本放入-80°C冰櫃中保存。

2. 由小鼠糞便抽取並純化腸道菌 DNA 並進行 PCR 放大

將小鼠糞便樣本切出定量(20-25mg)的團塊放入小離心管內，並加入 180μL ATL buffer 和 20μL proteinase K，在 56°C 下 3-4 小時使 DNA 溶出，經由離心和洗去雜質得純化的樣本 DNA，用 Nanodrop(超微量分光光度計)測量 DNA 吸光值詳細數值參見附錄一)，確認兩次之 DNA 量與純度(是否有雜質過多或未成功抽取 DNA 情形發生)。樣本 DNA 加入數組鑑定腸道菌專用引子(附錄二)取 16s rDNA V4V5 片段，再經由 PCR 放大腸道菌 DNA，PCR 產物進行次世代定序分析。

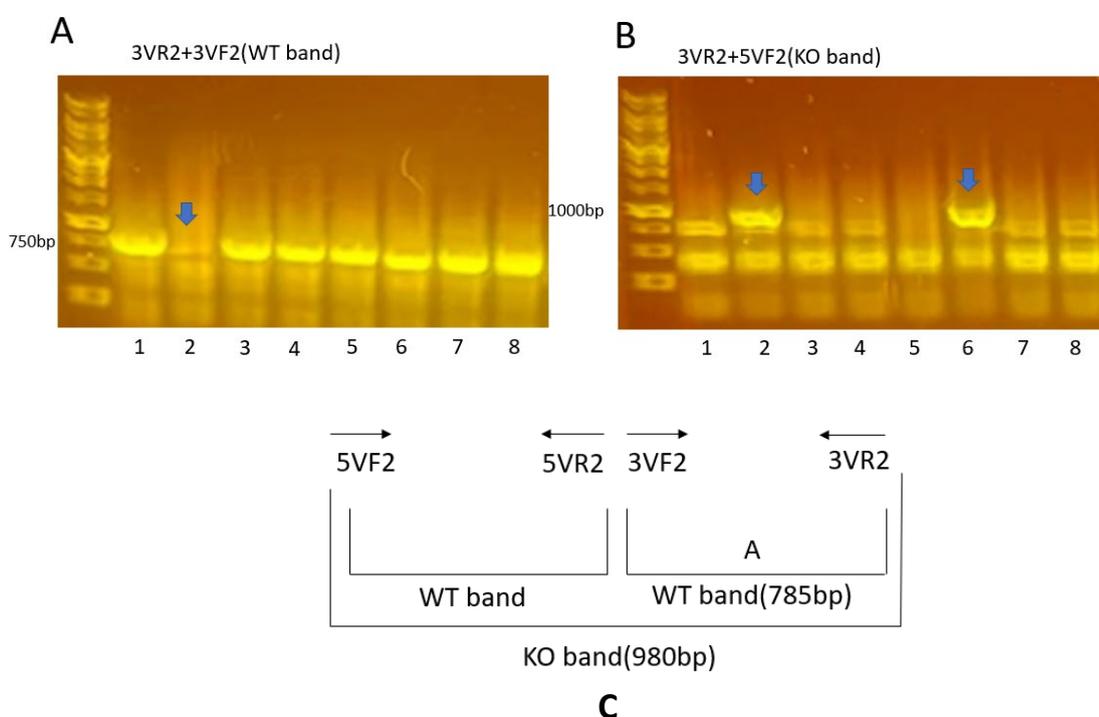
3.次世代基因定序 (Next Generation Sequencing, NGS)

進行以次世代基因定序(NGS)鑑定菌屬，再進一步用 QIIME2 軟體分析生理時鐘改變對小鼠腸道菌相的變化。

肆、研究結果

一、小鼠品種確認

首先確定實驗用的小鼠為單一品種，檢測基因型為LRRK2，此次實驗動物希望取得此基因為同型合子野生型老鼠(wildtype, WT/WT)，不帶有與神經相關疾病的患病基因，PCR產物電泳分析結果應出現785bp，若出現980bp則表示非單一品種，如圖八所示，A圖及B圖為兩種不同引子的電泳分析結果，C圖為此基因兩組引子的設計圖，若為單一品種應出現785bp條帶(樣本1.3.4.5.6.7.8)但不具有980bp條帶(樣本2及6號)。經電泳片段分析後確認編號1、3、4、5、7、8為我們需要的單一品種野生型小鼠。

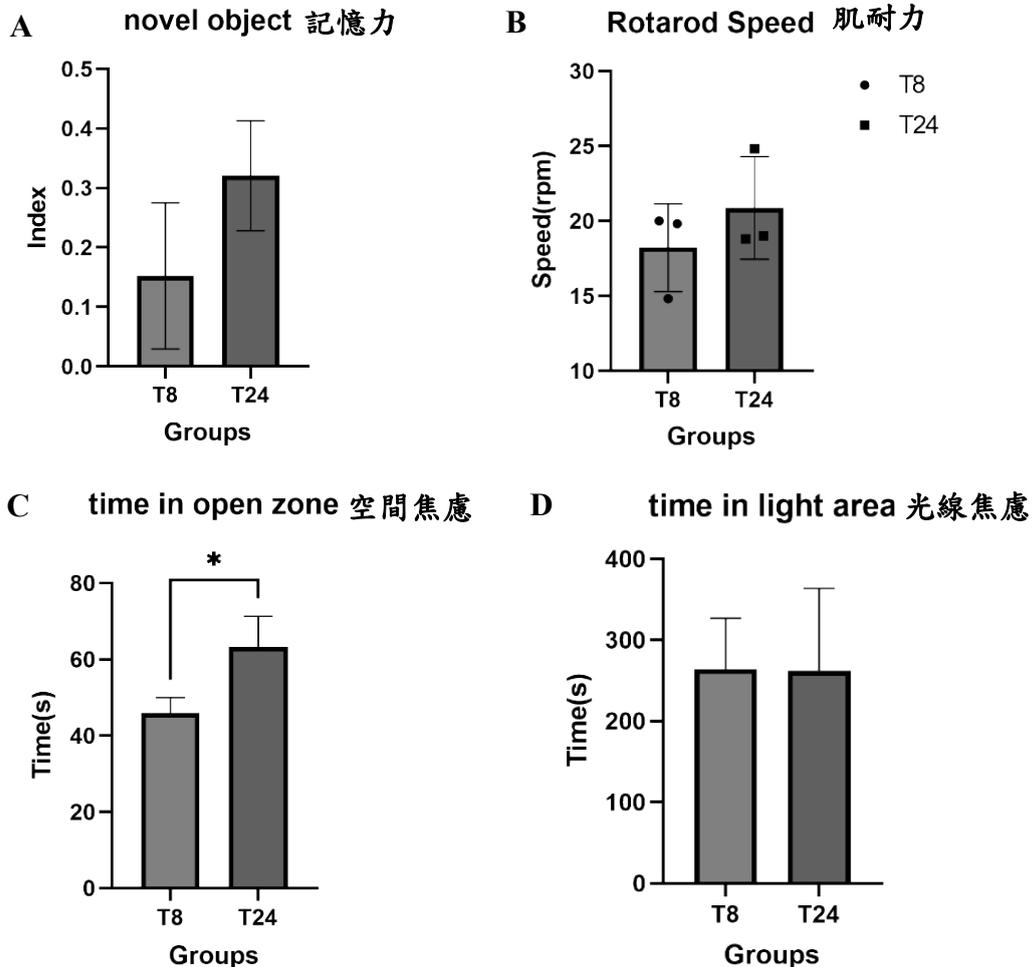


圖八：單一品種野生型小鼠應該出現785bp條帶但不具有980bp條帶。A圖為785bp長度片段確認電泳圖，編號2無此片段非野生型。B圖為980bp長度片段確認電泳圖，編號2、編號6有此片段非野生型。因此編號1、3、4、5、7、8為我們實驗對象單一品種野生型小鼠。C圖為兩對引子設計圖，其中WT表示野生型wild type，KO表示此基因被剔除型knock out。

二、生理時鐘混亂對小鼠四種行為的影響

我們將生理時鐘正常組與混亂組兩相比較，進行四種行為分析。圖九顯示四種行為測定數值再進行統計分析結果，A~D圖分別為辨識記憶(A)、肌耐力(B)、空間焦慮(C)及光線焦慮(D)，其中T8是混亂組，T24是正常組。可以看出，其中C圖中實驗組和對照組

有統計上顯著性差異(p值0.0277)，A、B組無顯著差異但可以看出明顯變化。發現混亂組相較於對照正常組小鼠空間焦慮顯著性增加，而記憶力、肌耐力等均有變弱的趨勢對光線焦慮並無顯著性影響



圖九：生理時鐘對老鼠四種行為模式實驗的影響，A~D圖分別為記憶力(A)、肌耐力(B)、空間焦慮(C)及光線焦慮(D)四種標準行為測試結果，其中T8是生理時鐘混亂組，T24是正常組。可以看出，四組中C圖中實驗組和對照組有統計上顯著性差異(p值0.0277)，A、B組無顯著差異但可以看出明顯變化。

- (A) T8 組有記憶衰退。T8、T24 novel object, n=3(each group) Two-tailed T Test :
P Pulse(0.1311)>0.05 not significantly
- (B) T8 組有肌耐力衰退。T8、T24 rotarod time, n=3(each group) Two-tailed T Test :
P Pulse(0.364)>0.05 not significantly
- (C) T8 組有顯著空間焦慮現象。T8、T24 openfield, n=3(each group) Two-tailed T Test :
P Pulse(0.0277)<0.05 significantly
- (D) 光線焦慮較無差異。T8、T24 light dark box, n=3(each group) Two-tailed T Test :
P Pulse(0.882)>0.05 not significantly

三、生理時鐘混亂對腸道菌相的影響

1. 菌屬多樣性的比較(以alpha diversity 為指標)

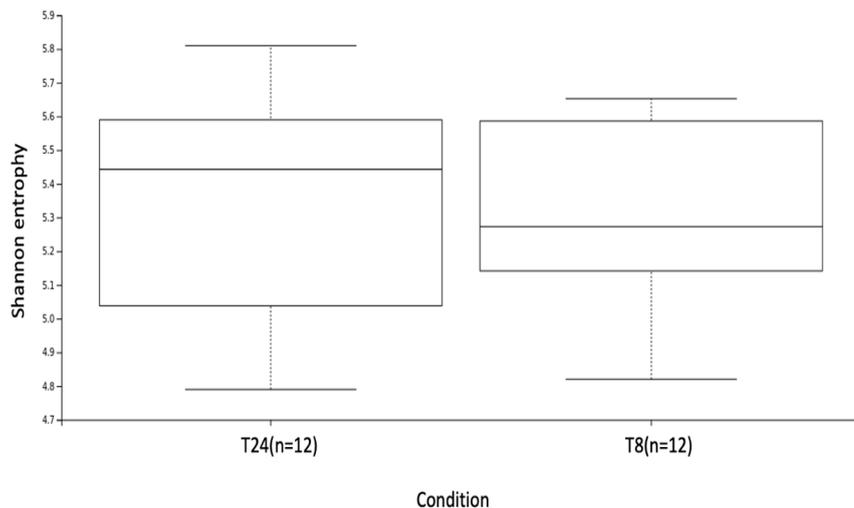
利用 QIIME2 軟體分析次世代定序後的菌種序列資料，經香儂指數 (Shannon-Wiener's Diversity Index)作為整體菌相多樣性指標，香儂指數用以表示菌相生態的多樣性，指數越高表示腸道菌屬豐富度越高。公式如下：

H' : Shannon-Wiener's Diversity Index

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

P_i :第 i 項物種的分佈，指群集中屬於第 i 種物種的個體比例，即該族群個體數量除以群集規模

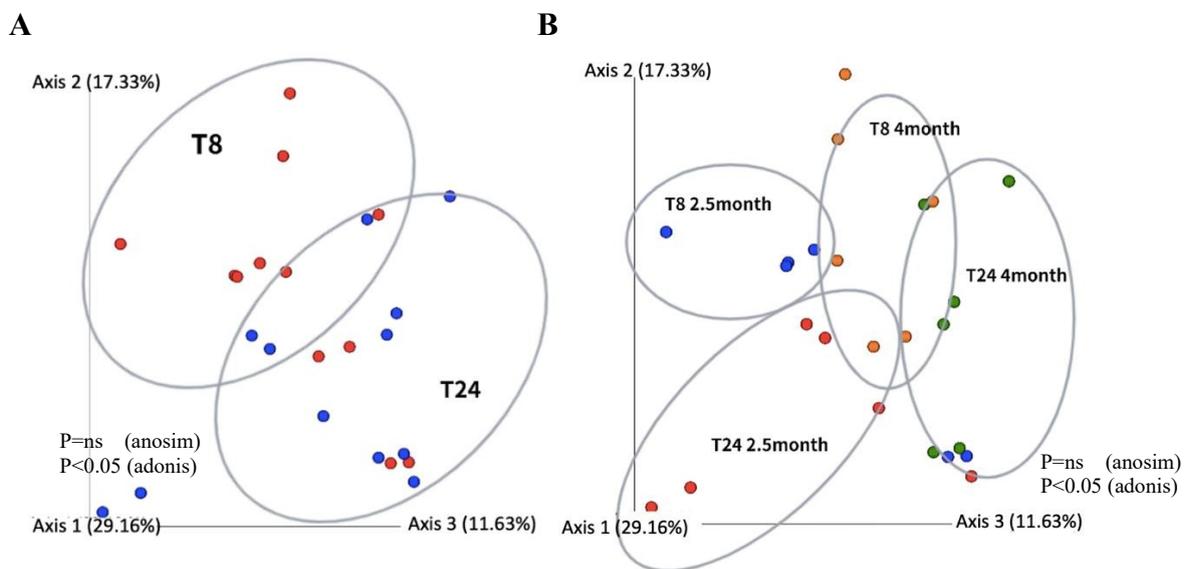
圖十為腸道菌相多樣性指標分析結果圖，以香儂指數來做為比較多樣性高低依據。我們的研究結果顯示生理週期混亂與正常對於整體菌屬的多樣性並無顯著性差異。



圖十：腸道菌屬多樣性比較圖(alpha diversity)圖中 T8 為混亂組與 T24 正常組在香儂指數上並無顯著性差異。

2.腸道菌種的比較

因為樣本數據處在各維度上，故我們利用降維分析(降至三維)PCOA圖來進行生理時鐘改變與否對菌屬的差異性比較，探討菌屬在同一屬分群的異同，結果如圖十一，A圖為T8混亂組與T24正常組腸道菌屬的分析圖(此為2.5及4個月樣本混合後再分析的結果，顯示實驗組和對照組的差異分析)，B圖為T8混亂組與T24正常組腸道菌屬的分析圖(此為2.5及4個月樣本單獨分析，可以區分出不同時間長短的生理週期混亂後的影響)，不論混合和單獨分析都可以看出明顯菌屬相的差異，而2.5和4個月也有菌相變化上的不同。綜合以上結果我們可以看出生理時鐘混亂的確會明顯造成特定菌相改變。



圖十一：P COA降維分析圖

T8小鼠於處理光照週期2.5個月及4個月時各於白天和黑夜固定時間收取糞便樣本。T24小鼠也於光照週期處理2.5個月及4個月時於白天和黑夜收取糞便樣本。各組為3隻小鼠， $n=6$ 。A圖顯示生理時鐘混亂T8組和生理時鐘正常對照T24組，腸道菌相分群上有明顯差異(藍色橢圓框表示分群範圍，重疊越少，表示分群明顯)，B圖顯示生理時鐘連續混亂處理2.5個月及連續4個月，亦可看到菌相有明顯分群差異(四個橢圓框範圍重疊少)。

T8 2.5 month: T8 組小鼠於生理時鐘連續混亂處理2.5個月時於早晚收取之數據

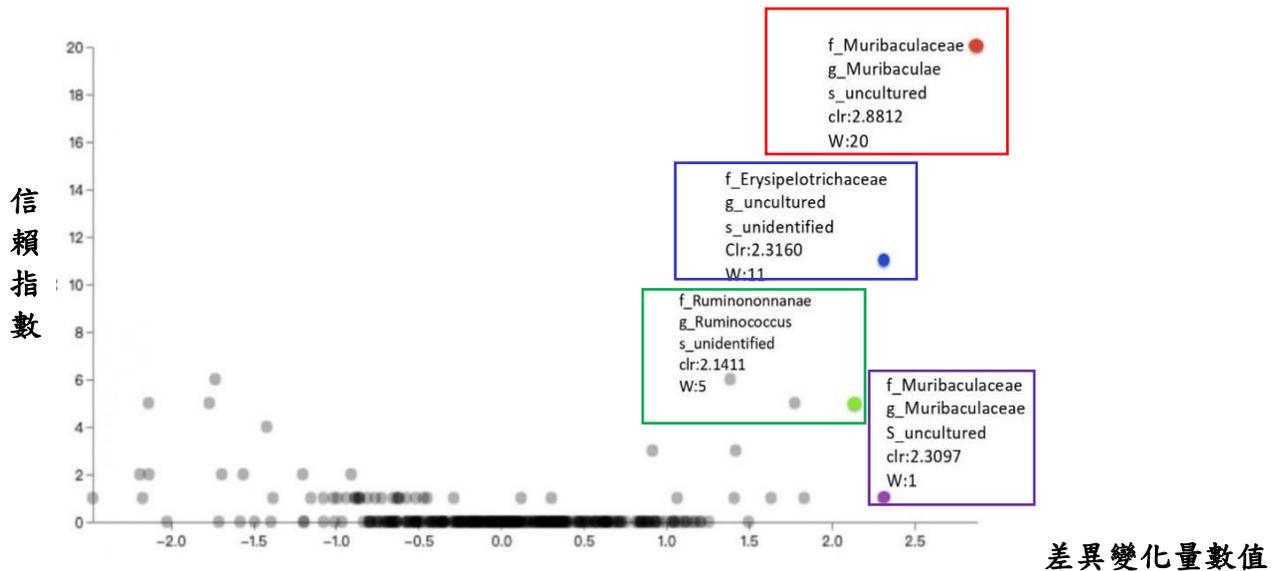
T8 4 month: T8 組小鼠於生理時鐘連續混亂處理4個月時於早晚收取之數據

T24 2.5 month: T24 組小鼠於生理時鐘連續混亂處理2.5個月時於早晚收取之數據

T24 4 month: T24 組小鼠於生理時鐘連續混亂處理4個月時於早晚收取之數據

4.再使用散佈圖(volcano plot)更精確分析單一菌屬的差異變化量：

腸道菌次世代結果數據，除了 T-test 統計分析比較外，我們採用另一種volcano plot 分析，我們將2.5個月和 4 個月收集的腸道菌定序分析數值混合後再進行散佈圖分析，試圖更細部了解混亂生理時鐘對哪些腸道菌屬有發生明顯改變。分析結果圖十三，橫軸為實驗組和對照組差異變化量數值，縱軸為信賴指數，圖中越右上角的菌屬表示生理時鐘改變造成的菌屬差異是越可信且越顯著。再從顯著性差異分析數據中我們找出具有明顯變化菌屬(細部分析的原始數據請參考附錄四)。圖十三為生理時鐘混亂與否的腸道菌相差異，從圖十三中看出紅色框中的Muribaculaceae、藍色框中的Erysipelotrichaceae以及綠色框中的Ruminococcaceae內的三種菌屬有較顯著且可信的差異變化量，紫色框中的菌屬差異變化大但信賴指數較低。



圖十三：2.5 個月及 4 個月混亂生理時鐘後將兩個時間樣本的腸道菌定序分析數值混合後，針對對特定菌相的變化量分析，x 軸表示差異變化量數值，y 軸表示信賴指數。本圖顯示實驗組(生理時鐘混亂)和對照組(生理時鐘正常組)相比較有差異的菌屬。從分析結果中我們挑選差異變化量數值大於 2 的四個菌屬，分別以紅、藍、綠、紫框區隔出來四個菌屬。

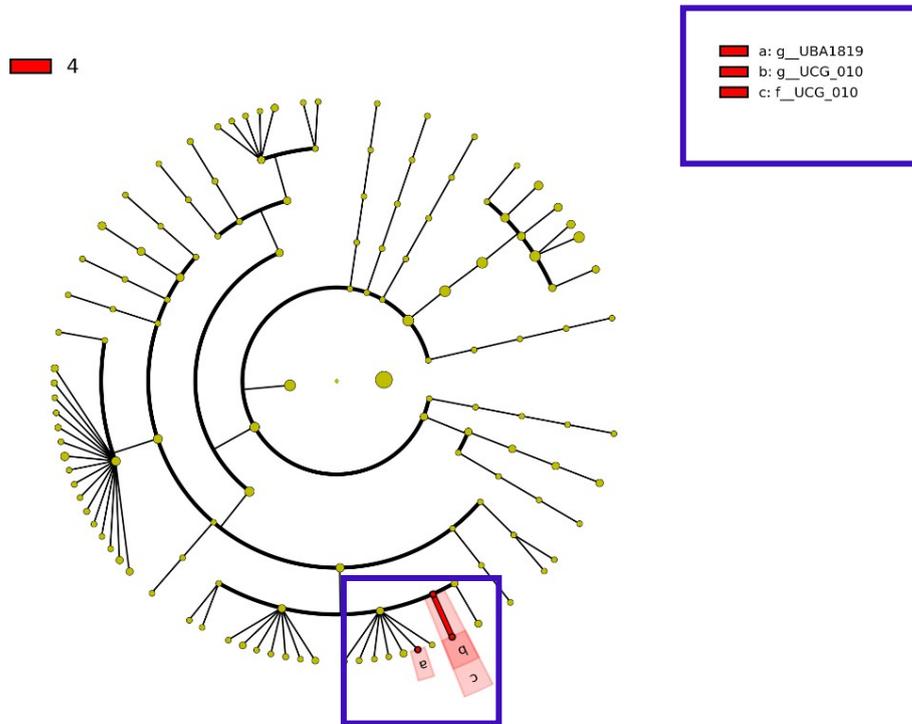
5.以支序圖分析鑑定腸道菌分群結果

我們再以次世代定序後的所有腸道菌 DNA 序列進行支序圖分析，目的為了判斷有差異菌種分群上是否有親緣關係上的相似性。此外，我們將生理時鐘混亂 2.5 個月以及 4 個月的支序圖，希望看出生理時鐘混亂持續時間長度對腸道菌的差異，圖十四為生理時鐘改變 2.5 個月後腸道菌相支序圖，圖十五為生理時鐘改變 4 月後腸道菌相支序圖。圖十四紅色圓框中的 a 處表示在生理時鐘混亂後有顯著差異變化的菌屬，黃色框中顯示此 Lachnospiraceae 菌屬的分類單元及 LDA 差異值，LDA SCORE 表示差異程度(差異 10^x 倍，X 為 LDA SCORE 值)。



圖十四：生理時鐘改變 2.5 個月後腸道菌相支序圖及其差異程度(LDA SCORE)分析結果圖，圖中顯示改變生理時鐘2.5個月後與對照組比較分析到Lachnospiraceae菌屬的差異。

圖十五為生理時鐘改變4個月後的腸道菌相支序圖，其中藍色方框中的a、b、c處表示在生理時鐘混亂後有顯著差異變化的菌屬，其中科名前面以 f_UCG-010 表示，屬名以 g_UCG-010 表示，藍色方色框中顯示 g_UBA1819 和 g_UCG-010 兩菌屬以及 f_UCG_010 菌科呈現分群上的差異。



有差異菌名(科名或屬名)	LDA score(X值)
科名：f_UCG-010表示，屬名：g_UCG-010	0.16
屬名：g_UBA1819	0.11

圖十五：生理時鐘改變4個月後的腸道菌相支序圖及其差異程度(LDA SCORE)數值，顯示改變生理時鐘4個後會造成g_UBA1819和g_UCG-010兩菌屬以及f_UCG_010菌科呈現分群上的差異。

四、腸道菌相與行為模式的關聯性探討

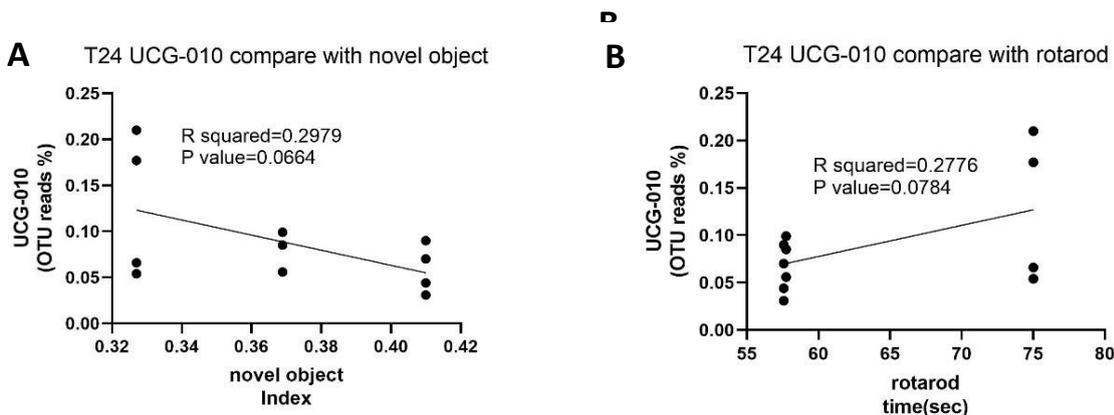
1. 進行回歸分析篩選有顯著性差異的菌屬與行為模式的相關性。

我們將T-test 分析結果與 volcano plot 以及支序圖三種腸道菌差異性分析結果，有重複出現至少兩次以上的菌屬六種，取其菌屬在正常(T24)與混亂(T8)組出現的百分比與四種行為模式量化值進行關聯性分析，計算關聯性係數 R square 原始值如附錄五的表六，表六中紅色框表示在正常組有較高相關，藍色框表示在混亂有較高相關，我們先以高相關性的菌屬進行個別正或負相關分析。

2. 六種單一菌屬與對應的行為模式正或負相關分析，我們僅挑出較有相關的數據呈現。

(1) g_UCG-010 菌屬與記憶力與肌耐力行為模式的相關程度分析

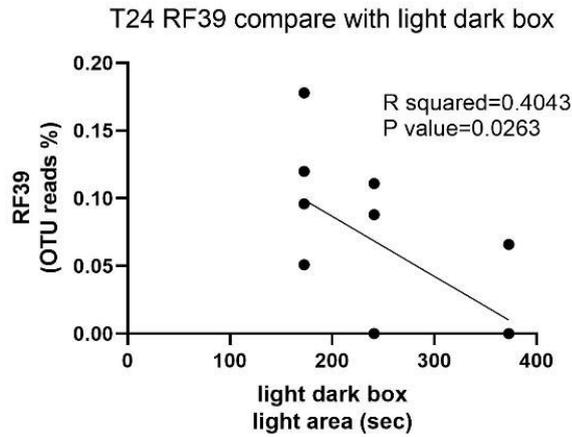
利用回歸分析相關係數 R square 值篩選後，將 UCG-010 與記憶力、肌耐力的相關性作圖如十六，我們發現 g_UCG-010 的量與記憶能力呈現低度負相關($R^2=0.2979$)，而與肌耐力呈現低度正相關($R^2=0.2776$)。



圖十六：A圖為g_UCG-010與記憶力相關分析圖，呈現低度負相關($R^2=0.2979$)； B圖為g_UCG-010與肌耐力相關分析圖，呈現低度正相關($R^2=0.2776$) $0<|R^2|<0.3$ 低度相關， $0.3<|R^2|<0.6$ 中度相關， $0.6<|R^2|<0.9$ 高度相關。

(2) **g_RF39** 菌屬與**光線焦慮**行為模式的相關程度分析

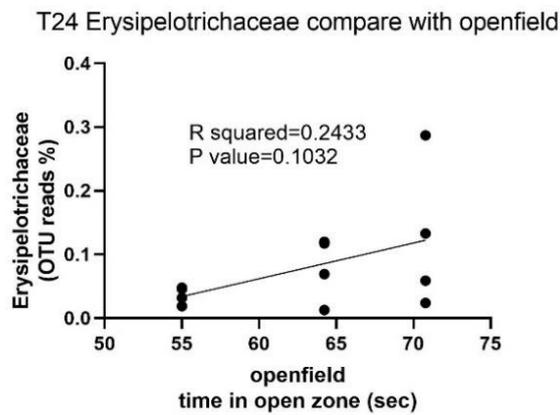
利用回歸分析相關係數 R square 值篩選後，將g_RF39 菌屬與光線焦慮的相關性作圖如圖十七，可以看出RF39菌屬含量與光線焦慮呈現中度負相關。(R²=0.4043)



圖十七：RF39 菌屬含量與光線焦慮相關性圖，呈現中度負相關(R²=0.4043)

(3) **g_Erysipelotrichaceae** 菌屬與**空間焦慮**行為模式的相關程度分析

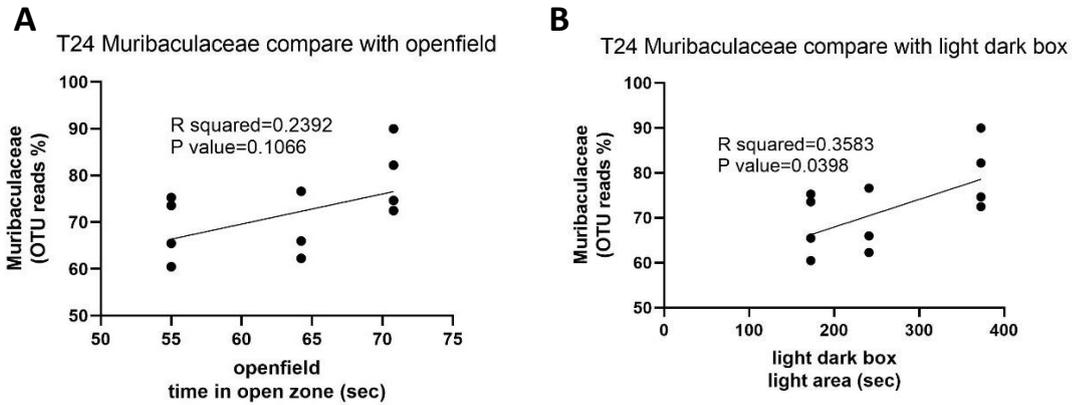
利用回歸分析相關係數 R square 值篩選後，將 Erysipelotrichaceae 菌屬與空間焦慮的相關性作圖如圖十八，可以看出呈現低度正相關(R²=0.2433)。



圖十八：Erysipelotrichaceae 菌屬含量與空間焦慮相關性圖，呈現低度正相關(R²=0.2433)

(4) Muribaculaceae 菌屬與空間焦慮和光線焦慮行為模式的相關程度分析

利用回歸分析相關係數 R square 值篩選後，將 Muribaculaceae 菌屬與空間焦慮和光線焦慮的相關性作圖如圖十九，可以看出可以看出呈現低度正相關。



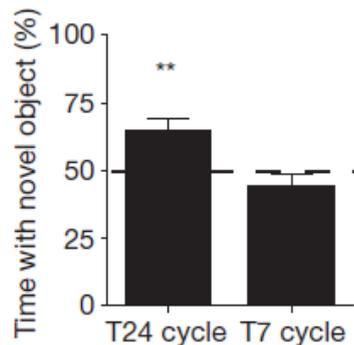
圖十九：A 圖為 Muribaculaceae 菌屬含量與空間焦慮相關性圖形，B 圖為光線焦慮相關性圖形，空間焦慮呈現低度負相關($R^2=0.2392$)；光線焦慮呈現中度正相關($R^2=0.3583$)。

綜合以上菌屬與行為相關性分析結果，我們發現有兩組呈現中度相關，有些菌屬是正相關，有些菌屬則為負相關，有些組別呈現低度相關，我們猜測單一菌種對行為的改變影響有限，行為的展現極有可能是多重菌屬的共同影響才能看出變化量。

伍、結果討論

一、與前人研究結果比較討論

記憶力標準化行為測定(Novel object recognition test) 能有效測定小鼠記憶能力(Leger, M.2012)，有研究指出縮短光照週期(3.5-3.5 小時交替黑暗與光照，以 7 小時為周期，簡稱 T7)造成生理時鐘混亂後的小鼠比正常生理時鐘週期(12-12 小時交替，簡稱 T24)的小鼠記憶能力差(Legates, T.A.,2012)，如圖二十所示。但 T7 的小鼠每天開關燈的時間都不一樣，一天的周期並非 24 小時(不是 24 的因數)，此研究同時有延長生理時鐘與混亂生理時鐘兩個變因干擾，記憶能力變差有可能是由混亂生理週期還是由延長生理週期影響皆有可能。而我們的研究顯示，生理時鐘混亂(4-4 小時交替黑暗與光照，簡稱 T8)的小鼠比正常生理時鐘(T24)的小鼠記憶能力差，T8 週期的小鼠每天開關燈的時間都一樣，一天的周期維持 24 小時(週期是 24 的因數)，所以我們能確定了記憶能力變差是與混亂生理週期相關。



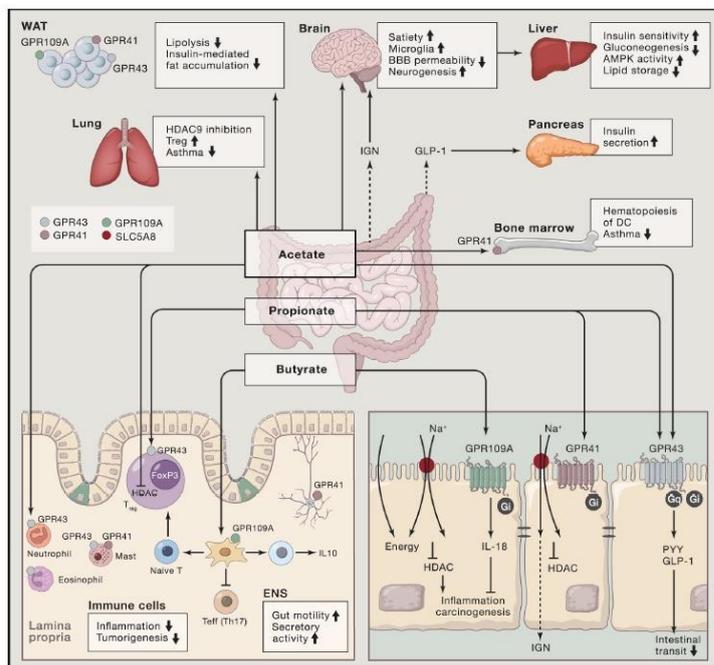
圖二十：T24 與 T7 生理時鐘週期小鼠記憶能力比較，圖中顯示生理時鐘混 T7 組有較差的記憶力。T7 mice showed deficit in novel object recognition (T24: n524, P50.0057; T7: n524,P50.1773). *P,0.05;**P,0.01. Error bars indicate s.e.m.(Legates, T.A.,2012)

二、腸道菌相結果

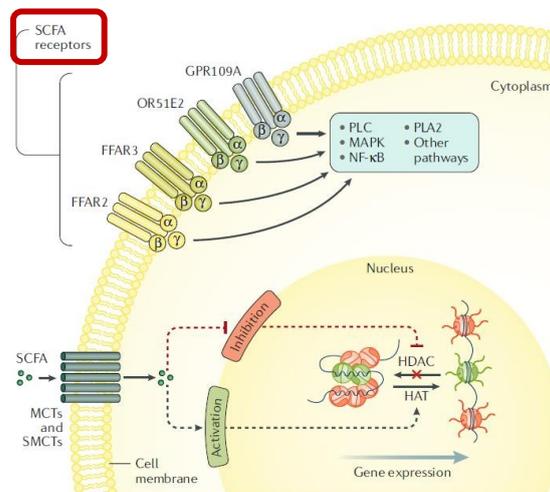
我們將有差異的腸道菌屬找出，經文獻搜查這些菌與疾病和代謝產物的研究報告，找出兩篇論文說明如下：

1. Lachnospirales NK4A136_group 菌屬減少會造成小鼠記憶喪失(Vanessa, S. et.al,2020)。
2. Lachnospiraceae 菌屬可產生丁酸鹽，Ruminococcaceae 和 Muribaculaceae 菌屬可產生丙酸鹽，RF39 菌屬可產生醋酸鹽。這些短鏈脂肪酸(SCFA)會造成胰島素分泌下降、脂肪分解下降、肝臟脂肪儲存下降、發炎反應下降、腫瘤產生下降(Koh, A. et al., 2016)，如圖二十一。另一文獻指出高血壓患者的丁酸鹽產生細菌水平

有顯著性降低(Lorena,C. et al.,2020)。前人也發現短鏈脂肪酸會透過腦腸軸(microbiota-gut-brain)影響大腦神經(Boushra, D. et al.,2019)，SCFA 受體為 FFAR2 和 FFAR3，丙酸可以透過 FFAR3 作用於周圍和中樞神經系統，誘導的腸道葡萄糖生成，造成短鏈脂肪酸影響中樞神經系統。短鏈脂肪酸會抑制組蛋白脫乙酰酶(HDAC)(圖二十二)，HDAC 可以調控基因表現。許多文獻提及 SCFA 與帕金森氏症，阿茲海默症、自閉症、抑鬱症有相關，詳細機制還有待進一步研究。因此我們找到這些腸道菌相多有與短鏈脂肪酸代謝相關，極可能透過腦腸軸此種機轉影響神經系統表現，進而改變行為模式。



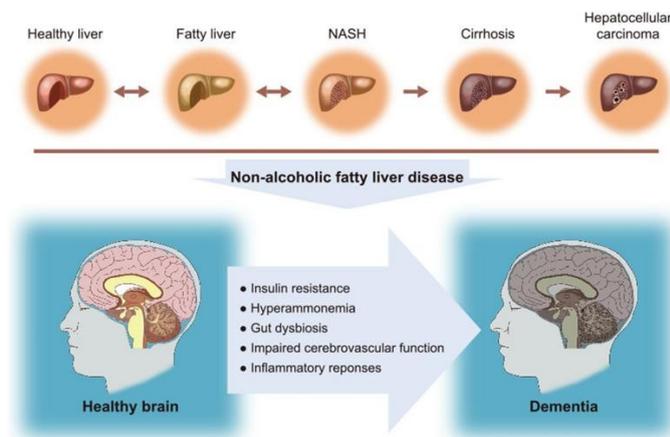
圖二十一：微生物產生的短鏈脂肪酸對各器官造成的影響(取自 Koh, A. et al., 2016)



圖二十二：短鏈脂肪酸與細胞的信號通路(取自 Boushra, D. et al.,2019)

三、腸道菌與行為模式實驗綜合分析結果

1. UCG-010 菌屬已被發現與脂肪肝有相關性，而長期脂肪肝可能會造成記憶力受損，產生失智症狀(Cheon, S.Y., Song, J. et.al,2022)，如圖二十三。而我們實驗結果顯示此菌與記憶力和肌耐力呈現相關，與前人發現失智結果相似，造成肌耐力的原因機轉尚待進一步探討。



圖二十三：長期脂肪肝可能造成失智症狀(取自 So Yeong Cheon et.al,2022)

2. RF39經比對兩項焦慮實驗(空間、光線焦慮)後皆呈現相關性。RF39之菌屬會因壓力而產生變化(Usui, N. et.al,2021)，此菌屬可作為小鼠壓力指標，我們實驗中發現生理時鐘混亂此菌會增加，推測因生理時鐘混亂對小鼠造成壓力，而導致展現在空間和光線焦慮行為上。
3. Muribaculaceae菌屬經比對兩項焦慮實驗(空間、光線)後皆呈現相關性。文獻指出Muribaculaceae菌屬會代謝產生丙酸鹽，與短鏈脂肪酸影響神經系統路徑有關，我們研究發現此菌屬改變會反應在小鼠行為的轉變上。
4. Lachnospirales NK4A136_group 雖與記憶力下降行為無關聯性，但腸道菌相中變化明顯，該菌相的減少也被證實與小鼠記憶力喪失相關(Vanessa, S. et.al,2020)。有可能記憶力下降本身不只有單一菌相改變的影響，因此單一菌種比對看不出關聯性。

陸、結論

(一)觀察生理時鐘混亂對小鼠行為的影響。

生理時鐘混亂相較於對照組會小鼠空間焦慮顯著的上升，而記憶力、肌耐力等均有變弱的趨勢，但光線焦慮無顯著差異。

(二)分析生理時鐘改變對腸道菌相的影響。

我們以T test、散布圖與支序圖分析，發現六種有顯著變化的菌屬。經參考資料查閱比對後，我們發現有兩種菌屬RF39、Muribaculaceae與焦慮行為展現有中度相關。一種菌屬UCG010與肌耐力及記憶力衰退呈現低度相關。

(三)探討腸道菌相和行為改變的關聯性。

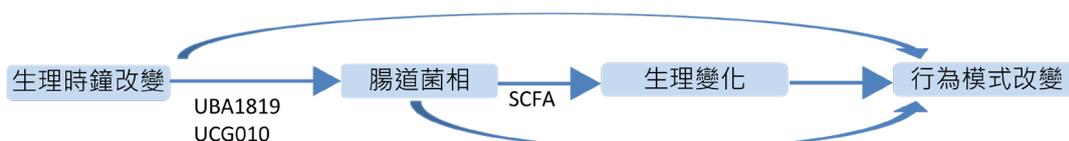
由我們實驗結果推測生理時鐘混亂將影響小鼠之腸道菌相，再藉由不同種腸道菌的改變影響小鼠之神經系統，對小鼠帶來生理及行為上的諸多變化。由腸道菌帶來的生理變化有脂肪肝及許多種潛在的神經系統疾病的風險，例如：帕金森氏症，阿茲海默症。心理及行為方面的變化上可歸類為：記憶力缺失和失智風險上升；由短鏈脂肪酸之變化可能帶來的自閉症、抑鬱症；小鼠焦慮行為。

(四)探討時間長短對腸道菌相的影響。

我們有進行生理時鐘混亂2.5及4個月菌屬相對含量的差異性比較(Heat map 分析結果表如附錄六)，可以看出生理時鐘混亂持續的時間長度對於菌屬含量也會隨之變動。

(五)由結果推論新模型

我們依據實驗及關連性分析結果，推測出以下可能模型，前人發現生理時鐘改變會會影響行為展現，另外，腸道菌相的不同變化也會有不同的行為表現，我們的關聯性研究分析結果指出生理時鐘混亂造成行為模式改變有可能透過腸道菌相間接影響。



圖二十四：推測模型(作者自繪)

柒、未來展望：

目前已發現混亂生理時鐘會造成小鼠行為模式的改變以及腸道菌中能產生短鏈脂肪酸的菌相減少，短鏈脂肪酸和許多生理機制和疾病有關連，未來值得進一步研究，可能的方向可以從下列兩項著手。

1. 控制短鏈脂肪酸的代謝的化學物質或許可以作為研發相關藥物的考量。
2. 混亂小鼠生理週期後是否可以再回復至正常週期，改變後的腸道菌和行為展現此現象是否具可逆性，值得深入探討。

捌、參考文獻

1. Alexander, L. Carlson . (2021). Infant Gut Microbiome Composition Is Associated with Non-Social Fear Behavior in a Pilot Study. *Nature Communications*, 3294.
2. Boushra, D. (2019). The Role of Short- Chain Fatty Acids in Microbiota–Gut–Brain Communication. *REVIEWS*, 16, 461–478. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
3. Cameron L. Prigge, Po-Ting Yeh, Nan-Fu Liou, Chi-Chan Lee, Shih-Feng You, Lei-Lei Liu, David S. McNeill, Kylie S. Chew, Samer Hattar, Shih-Kuo Chen, Dao-Qi Zhang M1 ipRGCs Influence Visual Function through Retrograde Signaling in the Retina. *Journal of Neuroscience* 6 July 2016, 36 (27) 7184-7197; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3500-15.2016
4. Cheon, S.Y., Song, J. Novel insights into non-alcoholic fatty liver disease and dementia: insulin resistance, hyperammonemia, gut dysbiosis, vascular impairment, and inflammation. *Cell Biosci* 12, 99 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00836-0>
5. Emeran a. mayer. (2022). The Gut–Brain Axis. *Annual Reviews*, 74, 439–453.
6. Husse, J. (2014). The Light-Dark Cycle Controls ‘Peripheral Rhythmicity In Mice with a Genetically Ablated Suprachiasmatic Nucleus Clock. *The FASEB Journal*, 28, 2950–2959. doi:10.1096/fj.14-256594
7. Koh, A. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, 165, 1332–1346. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.0417>.
8. Ramos, S. E. (2013). Learning and Working Memory In Mice Under Different Lighting Conditions. *RevNeuroscience*, 21(3),349–355. doi:10.4181/RNC.2013.21.834.7p
9. Legates, T. A. (2012). Aberrant Light Directly Impairs Mood and Learning through Melanopsin-Expressing Neurons. *LETTER*, 0, 1–7. doi:10.1038/nature11673
10. Lorena , C. (2020). Gut Metagenomic and Short Chain Fatty Acids Signature in Hypertension: A Cross-Sectional Study. *SCIENTIFIC REPORTS*, 10, 6436–6452.
11. Lu liu. (2018). Gut–Brain Axis and Mood Disorder. *Frontier*, 9, 1163–1181.
12. Marilia carabotti. (2015). The Gut-Brain Axis: Interactions between Enteric Microbiota, Central and Enteric Nervous Systems. *Ann Gastroenterol*, 28(2), 203–209.
13. Pearson, J. A. (2020). Crosstalk between Circadian Rhythms and the Microbiota. *Educational Result*, 278–290. doi:10.1111/imm.132
14. Silva, Y. P. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Neuroendocrine Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
14. Tsao, C. tsao. (2022). Influence of Diurnal Phase on Behavioral Tests of Sensorimotor

- Performance, Anxiety, Learning and Memory in Mice. *Scientific Reports*, 12(432), 1–8. doi:10.1038/s41598-021-03155-5
15. Teichman EM, O'Riordan KJ, Gahan CGM, Dinan TG, Cryan JF. When Rhythms Meet the Blues: Circadian Interactions with the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Cell Metab.* 2020 Mar 3;31(3):448-471. doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.008. PMID: 32130879.
 16. Usui N, Matsuzaki H, Shimada S. Characterization of Early Life Stress-Affected Gut Microbiota. *Brain Sci.* 2021 Jul 10;11(7):913. doi: 10.3390/brainsci11070913. PMID: 34356147; PMCID: PMC8306161.
 17. Vincent m. cassone. (2022). Chapter 42 - Circadian Rhythms. *Science Direct*, 1163–1181.
 18. Vanessa, S. (2020). Dysbiosis, Gut Barrier Dysfunction and Inflammation in Dementia: A Pilot Study. *BMC Geriatrics*, 20(248). <https://doi.org/10.1186/s12877-020-01644-2>
 19. Yan sun. (2023). Promotion of Astrocyte-Neuron Glutamate-Glutamine Shuttle by SCFA Contributes to the Alleviation of Alzheimer's Disease. *Science Direct*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102690>

附錄

附錄一：腸道菌抽取 DNA 樣本的吸光值

表三：各樣本對照的吸光值

#	Age	ZT	Sample	Weight (mg)	A260/A280	A260/A230	Conc. (ng/uL)
1519	2.5 L		4-1_L_2.5M		1.92	1.46	213.4
1520	2.5 L		4-2_L_2.5M		2.00	1.87	529.9
1521	2.5 L		4-3_L_2.5M		2.02	2.05	712.8
1522	2.5 L		12-1_L_2.5M		1.98	1.66	301.4
1523	2.5 L		12-2_L_2.5M		2.04	2.01	467.2
1524	2.5 L		12-3_L_2.5M		1.98	1.68	135.6
1525	2.5 D		4-1_D_2.5M		1.92	1.17	79.0
1526	2.5 D		4-2_D_2.5M		2.02	1.56	148.2
1527	2.5 D		4-3_D_2.5M		2.02	1.75	350.9
1528	2.5 D		12-1_D_2.5M		1.99	1.40	111.6
1529	2.5 D		12-2_D_2.5M		2.02	1.63	146.8
1530	2.5 D		12-3_D_2.5M		2.00	1.43	135.0
1531	4 L		4-1_L_4M		2.01	1.52	136.7
1532	4 L		4-2_L_4M		2.03	1.78	273.4
1533	4 L		4-3_L_4M		1.98	1.50	147.9
1534	4 L		12-1_L_4M		2.08	2.10	424.7
1535	4 L		12-2_L_4M		2.03	2.03	513.1
1536	4 L		12-3_L_4M		1.98	1.73	239.4
1537	4 D		4-1_D_4M		2.08	1.91	438.8
1538	4 D		4-2_D_4M		1.96	1.68	305.1
1539	4 D		4-3_D_4M		2.05	2.16	574.6
1540	4 D		12-1_D_4M		2.07	2.03	313.5
1541	4 D		12-2_D_4M		1.95	1.33	133.2
1542	4 D		12-3_D_4M		2.01	1.75	276.4

附錄二：鑑定腸道菌專用引子設計圖

Targets	Primers	Sequences (5'-3')	Tm (°C)
V4/5 region in <i>16S rRNA</i> (fecal)	563F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAG <u>AYTGGGYDTAAAGNG</u>	43
	926R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAG <u>CCGTCAATYYTTTRAGTTT</u>	

The underlined sequences indicate the primer for 16S gene regions, while other parts are the adaptors for the Nextera barcodes PCR.

圖二十七：Primers used in metagenomics sample preparatio

附錄三：以 T test 進行腸道菌相差異性分析的原始詳細的 p value

Bacteria 屬名	Erysipelotrichaceae	RF39	Ruminococcaceae, UBA1819	UCG-010
T test 結果 *p<0.05 **p<0.01	0.0299 (*)	0.0845	0.0097(**)	0.0874
腸道菌屬 多寡	T8> T24 (混亂組>正常組)	T8<T24	T8> T24	T8> T24

表四：腸道菌屬 T test結果分析(分析四個菌屬)

附錄四：腸道菌散佈圖各菌屬混亂組與對照組的差異性分析表

表五：volcano plot 結果

腸道菌屬 名稱	Muribaculaceae	Erysipelotrichaceae	Ruminococcaceae	Lachnospiraceae
腸道菌屬 差異	T8<T24 (混亂組<正常組)	T8<T24	T8<T24	T8<T24
顯著性 分析結果	Yes	No	No	Yes

附錄五：六種差異菌屬與行為模式的關聯性分析數值

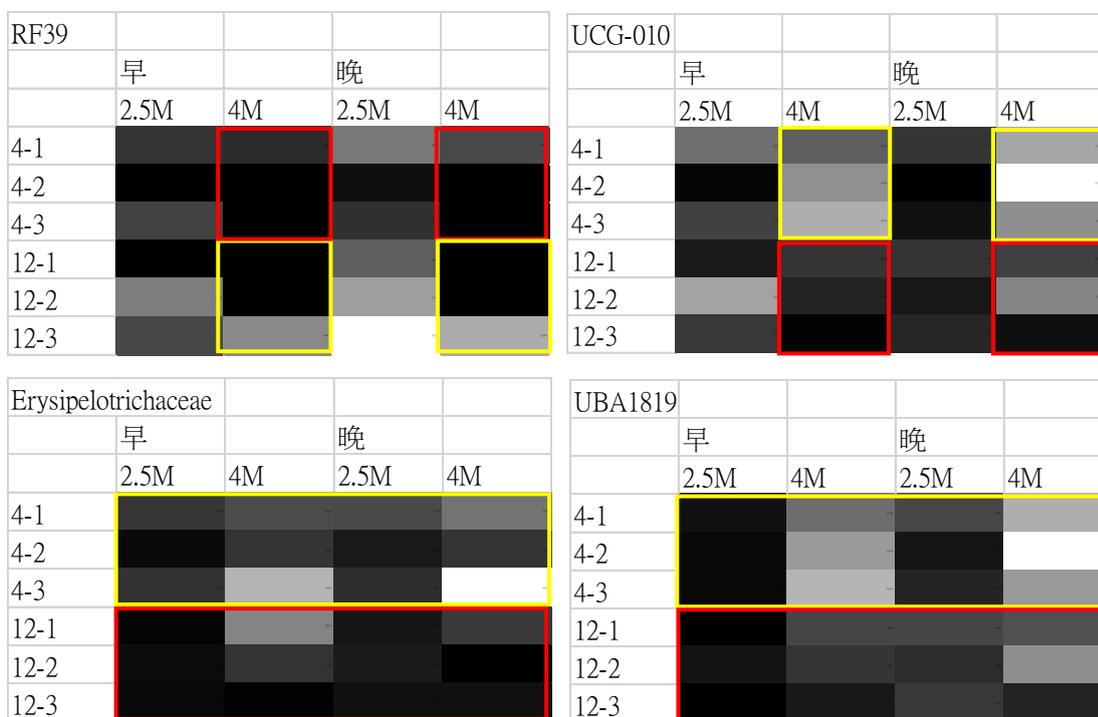
腸道菌屬	組別	行為模式			
		novel object	rota rod	openfield	light dark
UCG-010	T24正常組	0.2979	0.2776	0.0533	0.0069
	T8混亂組	0.0099	0.0007	0.0011	0.0008
NK4A136_group	T24正常組	0.0952	0.0859	0.0192	0.0032
	T8混亂組	0.0184	0.0809	0.0260	0.0832
RF39	T24正常組	0.1851	0.0145	0.4562	0.4043
	T8混亂組	0.0215	0.0243	0.5669	0.0321
Erysipelotrichaceae	T24正常組	0.0570	0.0000	0.2433	0.2398
	T8混亂組	0.4871	0.2670	0.0526	0.2571
UBA1819	T24正常組	0.0002	0.0275	0.0626	0.0863
	T8混亂組	0.0000	0.0979	0.3001	0.1082
Muribaculaceae	T24正常組	0.0096	0.1696	0.2392	0.3583
	T8混亂組	0.0121	0.1130	0.0564	0.1069

表六、腸道菌屬與行為出現的關聯性分析數據

圖中數字表示相關係數 R square 值，其中 $0 < |R^2| < 0.3$ 表示低度相關， $0.3 < |R^2| < 0.6$ 表示中度相關， $0.6 < |R^2| < 0.9$ 表示高度相關，紅字表示有較高相關，取相關性較高的組別再進行個別探討。

附錄六： Heat map 分析結果

我們將 T-test 分析結果與 volcano plot 以及支序圖三種腸道菌差異性分析結果，有重複出現至少兩次以上的菌屬六種，取其菌屬在正常(T24)與混亂(T8)組出現的百分比與採樣時間進行分析(圖表顏色越深此菌屬比例較少)，將差異較大的四種菌屬呈現不同時間細部結果如下所示，黃框為百分比較大的部分，紅框為百分比較小的部分。菌屬 UCG-010、RF39 在改變生理時鐘時間越長(4個月)，改變越明顯。菌屬 Erysipelotrichaceae、UBA1819 在改變生理時鐘(2個月)，就有明顯變化。特定菌屬產生改變所需要的時數(月份)不一樣，有些2.5個月就會有影響，有些則需要4個月才會有影響。



四種菌屬 heat map。特定菌屬產生改變所需要的時數(月份)不一樣，有些2.5個月就會有影響，有些則需要4個月才會有影響。