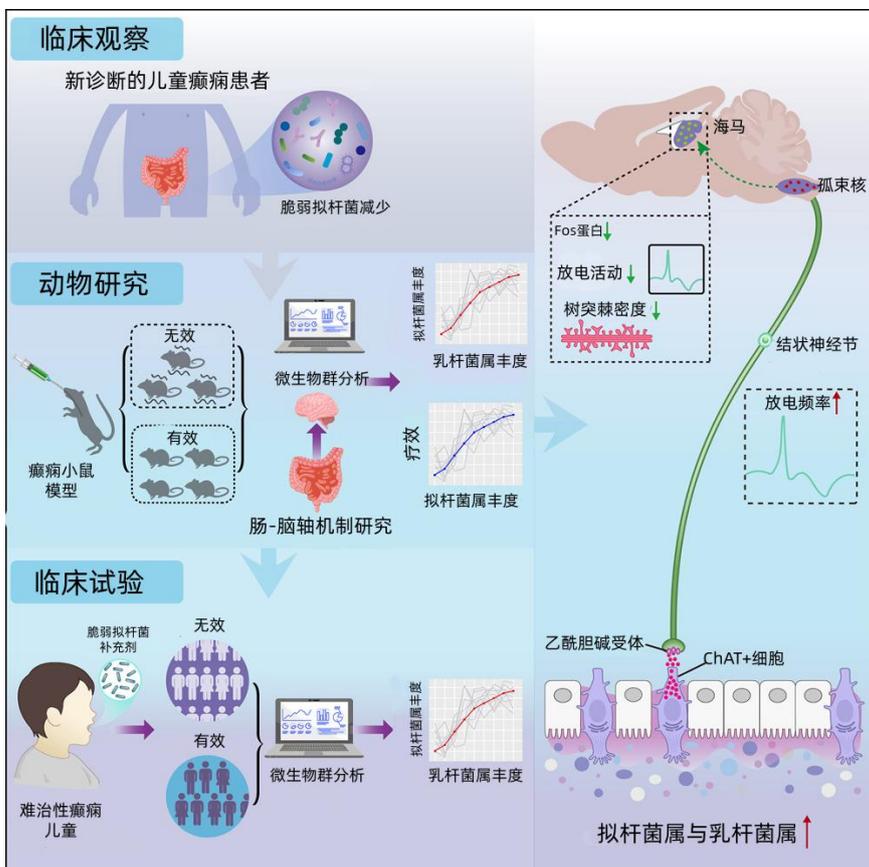


肠道-大脑胆碱能信号介导脆弱拟杆菌的抗癫痫作用

图文摘要



作者

贾艺聪, 陈鸿, 邹骞辉, ..., 陈祖昕, 操德智, 刘欣安

通讯作者

zx.chen3@siat.ac.cn (Z. C.),
caodezhi888@aliyun.com (D. C.),
xa.liu@siat.ac.cn (X.-a.L.)

概要

贾艺聪等人表明, 脆弱拟杆菌的抗癫痫作用是通过增强肠道-迷走神经-大脑轴上的胆碱能信号传导介导的, 并因乳酸杆菌在肠道的定植而得到强化。这些发现揭示了微生物群-神经环路之间的相互作用, 对儿童难治性癫痫具有转化医学意义。

亮点

- 脆弱拟杆菌通过迷走神经介导的肠道-大脑胆碱能信号传导抑制癫痫发作
- 它激活结肠 ChAT 阳性细胞, 以增强乙酰胆碱介导的迷走神经传递
- 抗癫痫作用与肠道内乳酸杆菌定植的富集相关
- 一项临床试验证实了其对儿童难治性癫痫的抗发作疗效

摘要

肠道菌群失调与癫痫相关，但益生菌的疗效与作用机制尚不明确。本研究首先发现，癫痫患儿肠道内的**脆弱拟杆菌**显著减少。通过口服给予**脆弱拟杆菌**，可在戊四氮和海人酸诱导的两种小鼠癫痫模型中有效抑制癫痫发作。机制研究表明，**脆弱拟杆菌**能激活结肠**胆碱乙酰转移酶阳性细胞**，并增强**肠道-迷走神经-大脑胆碱能信号传导**；这一结论通过迷走神经电生理记录、药理学阻断及化学遗传学操控实验得到证实，从而鉴定出一条介导癫痫抑制的**结肠 ChAT 阳性细胞-结状神经节神经环路**。其抗癫痫作用与肠道内**乳酸杆菌**定植的富集相关。一项随机临床试验（注册号：ChiCTR2100042203）进一步证实了**脆弱拟杆菌**对儿童难治性癫痫的治疗效果。这些发现阐明了一条**脆弱拟杆菌**发挥抗癫痫作用的**肠道-大脑胆碱能通路**，并为针对微生物群的癫痫疗法奠定了机制基础。

引言

儿童癫痫是最常见的儿童神经系统疾病之一，常干扰发育，并以反复发作为特征。约 10% - 30% 的患者会发展为难治性癫痫，这突显了对有效且安全治疗干预措施的迫切需求[1 - 5]。

肠道微生物群在整个生命周期中，对宿主的生理和行为起着关键的调节作用[6 - 9]。越来越多的证据将微生物群失调与神经发育障碍联系起来，包括自闭症谱系障碍和儿童癫痫[10 - 12]。来自动物模型和临床病例的新兴研究指出，肠道菌群失调与特定类型的癫痫之间存在潜在关联[11, 13, 14]。诸如生酮饮食等非药物干预措施，已被证明对控制儿童难治性癫痫有效[14]。尽管基于微生物群的疗法——如粪便微生物群移植、生酮饮食和益生菌——的研究仍然有限，但它们提供了希望，尤其是在常规治疗无效或引起不良反应的情况下[13 - 15]。然而，其疗效取决于益生菌在肠道内的生态位[16 - 18]。微生物群组成的个体间差异是转化应用的主要障碍。虽然肠道微生物明显影响癫痫发作活动，但关于其组成和功能变化的相关性仍不确定，因为大多数认识来源于动物研究。阐明微生物群驱动

的神经信号——尤其是那些通过迷走神经传递的信号——如何影响脑功能，可能揭示新的治疗途径。

大脑的胆碱能系统通过乙酰胆碱受体亚型调节神经元兴奋性和突触可塑性[19, 20]，并在癫痫中起着关键作用[21]。内侧隔区-海马胆碱能回路已被证明能在动物模型和患者中抑制癫痫发作[22]。肠道胆碱能信号传导同样至关重要，胆碱能神经元激活上皮细胞中的钙电流以维持肠道稳态，而肠道微生物则通过兴奋性胆碱能通路调节宿主行为[23, 24]。这些发现意味着，肠道微生物群介导的胆碱能通路可能通过肠脑通讯调节与癫痫相关的神经活动。

本研究旨在阐明微生物群-肠道-大脑轴介导益生菌诱导的癫痫抑制的机制[25, 26]。利用戊四氮和海人酸诱导的癫痫发作模型[27, 28]，并结合临床研究，我们证明脆弱拟杆菌通过增强迷走神经介导的胆碱能肠道-大脑信号传导来发挥抗癫痫作用，这一效应由一个明确的结肠胆碱乙酰转移酶阳性神经元环路所支持。其治疗效果进一步受到与乳酸杆菌生态互作的影响，并在难治性癫痫儿童中得到验证。

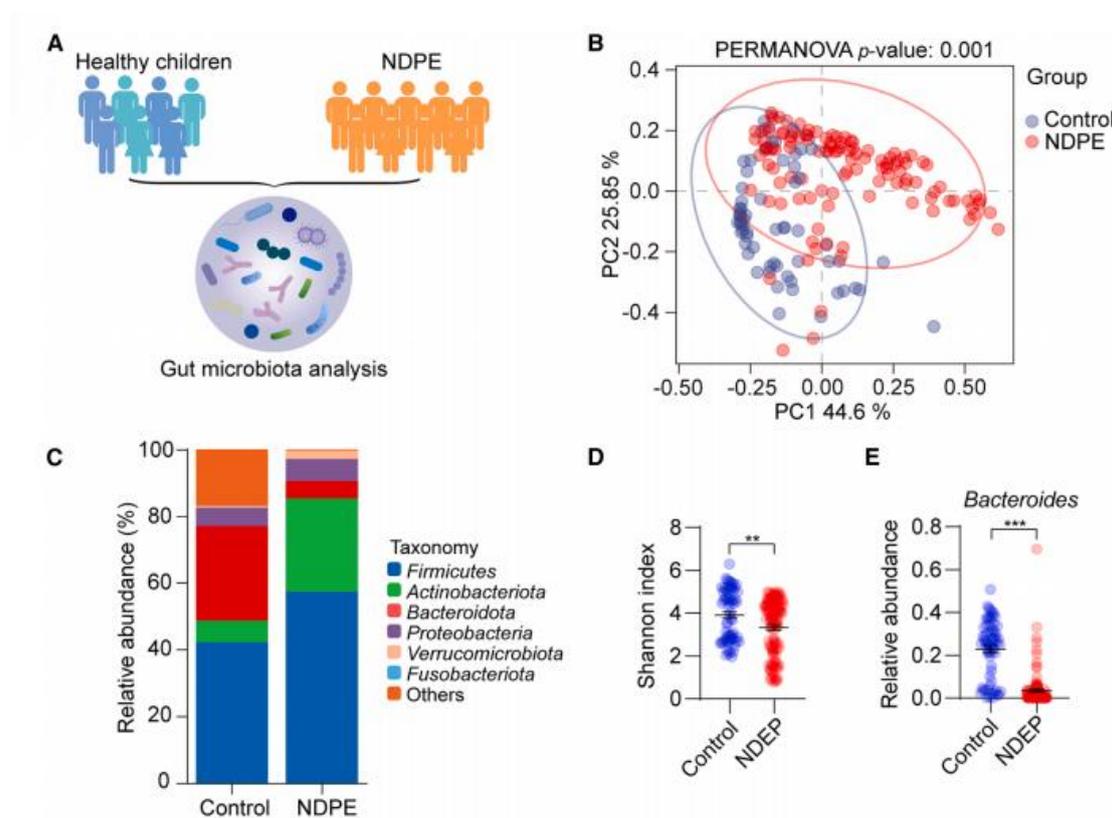
结果

儿童癫痫患者粪便中脆弱拟杆菌丰度降低

既往研究表明，癫痫患者的肠道微生物群组成发生改变，这提示针对微生物群的治疗策略可能为癫痫治疗带来希望[14, 29]。为探究癫痫患儿的肠道微生物群变化，我们对 114 名新诊断儿童癫痫患者和 63 名健康对照者的粪便样本进行了 16S rRNA 基因测序（图 1A；表 S1 和 S2）。NDPE 组与对照组之间观察到肠道微生物群组成的显著差异（图 1B 和 1C），且 NDPE 组的 α 多样性较对照组降低（NDPE: 3.333 ± 0.12 vs. 对照: 3.91 ± 0.15 ; $p = 0.004$ ）（图 1D）。值得注意的是，在属水平上，NDPE 组中拟杆菌属的丰度显著低于健康对照组（NDPE: 0.034 ± 0.008 vs. 对照: 0.23 ± 0.017 , $p < 0.001$ ）（图 1E）。而其他菌属，如埃希氏菌属（NDPE: 0.045 ± 0.01 vs. 对照: 0.04 ± 0.01 ; $p = 0.7679$ ）、普雷沃菌属（NDPE: 0.018 ± 0.006 vs. 对照: 0.017 ± 0.005 ; $p = 0.9013$ ）和乳杆菌属（NDPE: 0.005 ± 0.002 vs. 对照: 0.0025 ± 0.001 ; $p = 0.4092$ ）

未显示显著差异，但副拟杆菌属水平在对照组中明显更高（NDPE：0.0045 ± 0.0026 vs. 对照：0.012 ± 0.0017， $p = 0.0343$ ）（图 1F - 1I）。

为验证 NDPE 中 16S rRNA 基因测序鉴定的分类谱，并进一步评估耐药性癫痫患儿的微生物改变，我们对健康对照者（ $n = 39$ ）和难治性癫痫患儿（ $n = 37$ ）的粪便样本进行了宏基因组测序（表 S3）。与 16S rRNA 基因测序结果一致，宏基因组分析揭示了两组间肠道微生物组成的显著改变（图 1J 和 1K）。值得注意的是，与对照组（0.033 ± 0.003）相比，癫痫组中脆弱拟杆菌的丰度显著降低（0.023 ± 0.004； $p = 0.032$ ；图 1L）。两组之间检测到的大多数其他拟杆菌属或乳杆菌属物种的相对丰度未观察到统计学上的显著差异（图 S1A 和 S1B）。这些发现提示，肠道微生物群的变化——特别是脆弱拟杆菌丰度的降低——可能与儿童癫痫存在潜在关联，这与先前的研究一致。这一观察结果强调需要进一步研究以阐明其背后由肠-脑轴介导的机制。特别是，难治性癫痫患儿脆弱拟杆菌水平的降低，为针对儿童癫痫肠道微生物群的干预提供了方向。



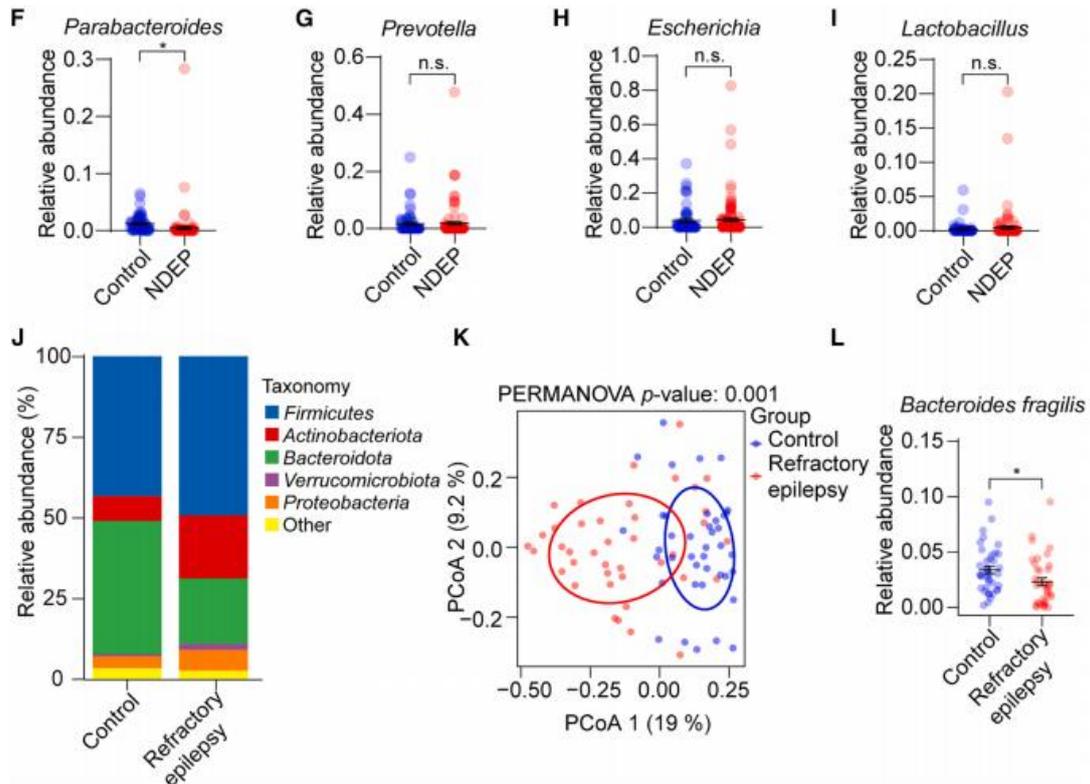


图 1. 儿童癫痫患者（包括新诊断及难治性病例）粪便微生物群组成的改变

(A) 实验方法示意图。

(B) 基于加权 UniFrac 矩阵, 在属水平对健康儿童与 NDPE 患者肠道微生物群组成进行的主坐标分析。点的形状和颜色代表个体样本。彩色椭圆表示健康儿童与 NDPE 患者组内的 95% 置信区间范围。

(C) 健康儿童 (n = 63) 与 NDPE 患者 (n = 114) 肠道细菌门水平的相对丰度。

(D) 肠道微生物群的香农 α 多样性指数 (非配对 t 检验)。

(E) 拟杆菌属的相对丰度 (非配对 t 检验)。

(F) 副拟杆菌属的相对丰度 (非配对 t 检验)。

(G) 普雷沃菌属的相对丰度 (非配对 t 检验)。

(H) 埃希氏菌属的相对丰度 (非配对 t 检验)。

(I) 乳杆菌属的相对丰度 (非配对 t 检验)。

(J) 对健康儿童 (n = 39) 与难治性癫痫患者 (n = 37) 肠道细菌门水平的宏基因组测序分析。显示了各组的相对丰度。

(K) 基于加权 UniFrac 距离, 在属水平对肠道微生物群组成进行的主坐标分析。每个点代表一个个体样本; 形状和颜色区分健康组与难治性癫痫组。彩色椭圆表示 95% 置信区间。

(L) 脆弱拟杆菌的相对丰度（非配对 t 检验）。

数据以均值 \pm 标准误表示。

另见图 S1，表 S1、S2、S3，以及数据 S1 和 S2。

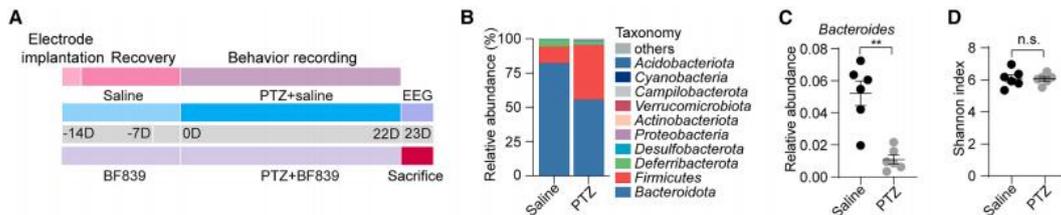
脆弱拟杆菌在小鼠中的抗癫痫作用

鉴于拟杆菌属丰度降低可能对癫痫发作有贡献，通过引入拟杆菌属来恢复癫痫患儿的肠道微生物群平衡可能影响疾病进程。为检验拟杆菌属的抗癫痫作用，我们对 PTZ 诱导的癫痫小鼠施用了含有脆弱拟杆菌的商业化益生菌 BF839。BF839 是一种在厌氧条件下从健康婴儿粪便中分离的无毒菌株[30, 31]。近期研究强调了非产毒性脆弱拟杆菌与免疫系统调节之间的关联，表明特定菌株可作为潜在的益生菌来缓解肠道微生物失衡[32, 33]。因此，我们首先在小鼠模型中测试了 BF839 作为儿童癫痫治疗手段的潜力。

戊四氮诱导的癫痫模型因对多种抗癫痫药物具有抵抗性而被广泛用于评估新型抗惊厥药[28, 34]。在本研究中，雄性 C57BL/6 幼鼠（4 周龄）在 PTZ 诱导癫痫发作前，通过口服灌胃给予 BF839（ 1×10^9 菌落形成单位/天），持续 7 天（图 2A）。肠道微生物群分析显示，拟杆菌门和厚壁菌门在生理盐水组和 PTZ 组中均为最主要的门（图 2B）。与生理盐水组相比，在 PTZ 处理小鼠的粪便样本中观察到拟杆菌属丰度显著降低（生理盐水组： 0.052 ± 0.007 vs. PTZ 组： 0.011 ± 0.003 ； $p = 0.0021$ ）（图 2C）。统计分析显示，治疗组间的香农指数无显著差异（生理盐水组： 6.09 ± 0.23 vs. PTZ 组： 6.05 ± 0.13 ； $p = 0.8879$ ）（图 2D）。随后的慢性自发性惊厥发作量化显示，与 PTZ 组小鼠相比，经 BF839 处理的小鼠从 PTZ 注射后第 3 天开始，癫痫发作频率显著降低（图 2E）。视频分析进一步揭示，PTZ 组的发作严重程度逐渐增加，而 BF839 处理小鼠在 PTZ 注射第 4 天后发作严重程度降低并趋于稳定（图 2F）。BF839 + PTZ 组的平均癫痫发作评分显著低于 PTZ 组（BF839 + PTZ： 1.71 ± 0.10 vs. PTZ： 2.32 ± 0.11 ； $p < 0.001$ ）（图 2G）。

在模拟以海马异常放电为特征的难治性颞叶癫痫的 PTZ 诱导点燃模型中, 采用脑电图评估 BF839 对海马过度兴奋的影响[35]。癫痫发作期间海马的代表性 EEG 模式见图 2H, 相应的频谱分析见图 2I。BF839 处理显著降低了 θ 波 (PTZ: $8,262.89 \pm 742.69 \mu V^2$ vs. BF839 + PTZ: $3,983.34 \pm 327.44 \mu V^2$; $p = 0.0022$)、 α 波 (PTZ: $2,892.20 \pm 250.90 \mu V^2$ vs. BF839 + PTZ: $1,229.80 \pm 138.14 \mu V^2$; $p = 0.0022$) 和 β 波 (PTZ: $918.74 \pm 149.55 \mu V^2$ vs. BF839 + PTZ: $361.17 \pm 36.85 \mu V^2$; $p = 0.0087$) 的功率谱密度, 而对 δ 波活动 (PTZ: $13,299.31 \pm 3,398.75 \mu V^2$ vs. BF839 + PTZ: $12,082.84 \pm 3,212.86 \mu V^2$; $p = 0.8182$) 无显著影响。我们进一步关注了棘慢波放电, 这是癫痫发作的一个关键电生理标志, 其特征是神经元同步化过度活跃 (图 2J) [36]。与 PTZ 诱导的未治疗组相比, BF839 处理小鼠的 SWD 棘波密度 (PTZ: 2.11 ± 0.07 vs. BF839 + PTZ: 1.22 ± 0.18 ; $p = 0.0043$) (图 2K) 和棘波持续时间 (PTZ: 757.85 ± 26.56 s vs. BF839 + PTZ: 438.067 ± 65.40 s; $p = 0.0043$) (图 2L) 均出现统计学上的显著降低, 表明发作期放电强度显著减弱。

海马神经元的过度兴奋常伴随树突棘形态异常[37]。为研究此点, 采用高尔基染色评估树突棘密度, 结果显示与 PTZ 组相比, BF839 处理小鼠的棘密度显著降低, 而棘长度未观察到变化 (图 2M - 2O)。这些结果进一步通过重组腺相关病毒 (rAAV)-非细胞类型特异性稀疏 (NCSP)-YFP-2E5 病毒标记海马齿状回神经元得到证实, BF839 处理同样降低了树突棘密度 (PTZ: 2.80 ± 0.346 vs. BF839 + PTZ: 1.04 ± 0.124 ; $p = 0.0088$), 但不影响棘长度 (PTZ: 2.10 ± 0.12 vs. BF839 + PTZ: 2.17 ± 0.097 ; $p = 0.6408$) (图 2P)。鉴于树突结构异常与自发性反复发作发展之间的联系, 该结果确定了 BF839 对 PTZ 诱导癫痫小鼠海马棘-树突重塑的影响, 也提示其抗癫痫作用背后存在肠-脑轴机制。



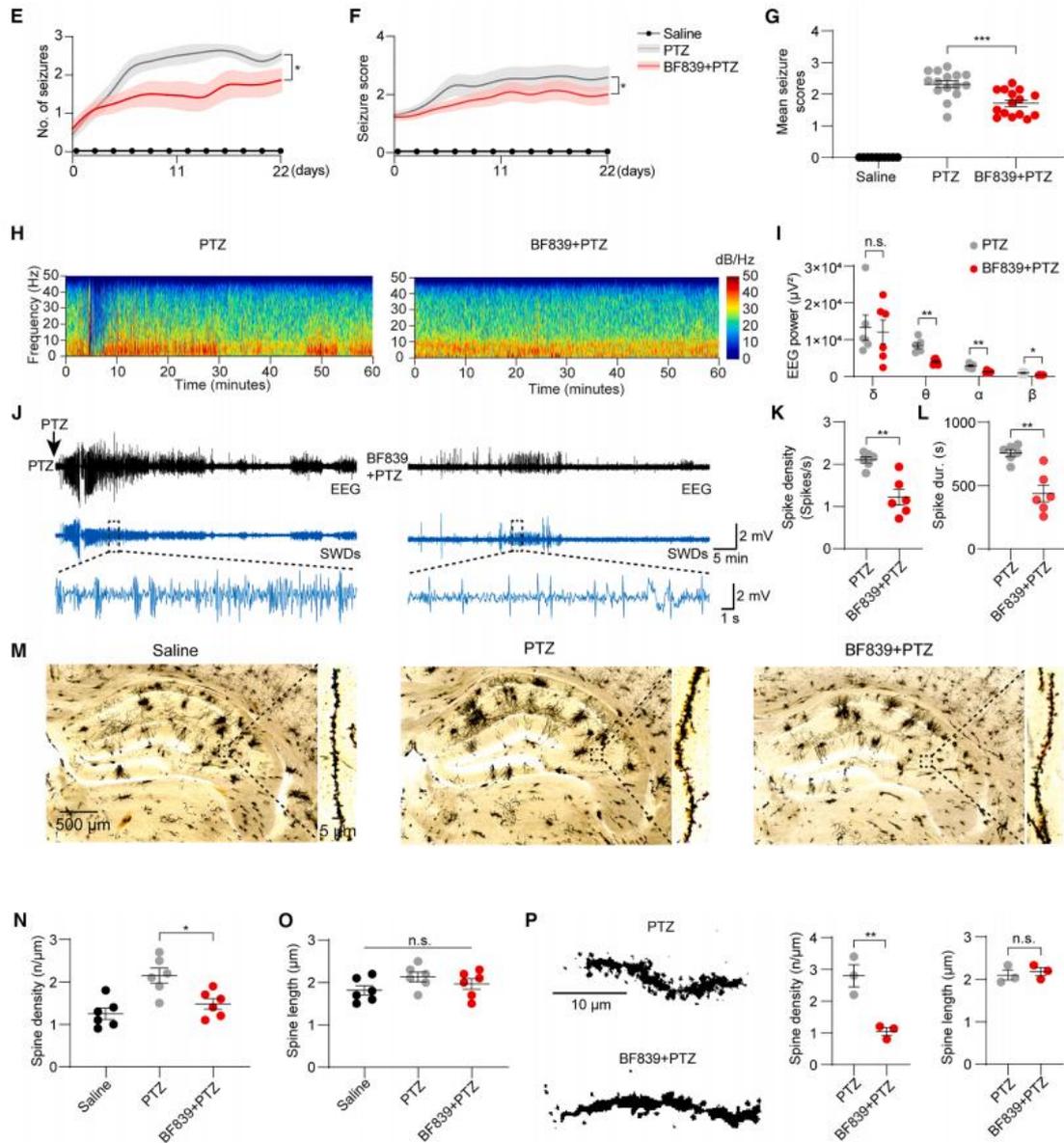


图 2. BF839 减少 PTZ 诱导的癫痫发作并调节海马神经元突触活性

- (A) 实验流程时间线。
- (B) 生理盐水处理小鼠 ($n = 6$) 与 PTZ 诱导癫痫小鼠 ($n = 6$ /组) 肠道细菌门水平的相对丰度。
- (C) 拟杆菌属的相对丰度 ($n = 6$ /组) (韦尔奇 t 检验)。
- (D) 分组数据中肠道微生物群的香农 α 多样性指数 ($n = 6$ /组) (韦尔奇 t 检验)。
- (E) PTZ 注射后各组每只动物每天的癫痫发作次数 (曼-惠特尼检验, $*p < 0.05$)。
- (F) PTZ 注射后每只动物每天的平均癫痫发作评分 (曼-惠特尼检验)。
- (G) 每只动物在 12 次 PTZ 注射期间每天的平均癫痫发作评分 (生理盐水组, $n = 6$; PTZ 组和 BF839 组, $n = 15$) (非配对 t 检验)。

- (H) PTZ 组和 BF839 + PTZ 组癫痫发作期间记录的海马代表性 EEG 轨迹和功率谱图。
- (I) 癫痫发作期间海马 EEG 的频谱分析 (n = 6/组) (曼-惠特尼检验)。
- (J) PTZ 注射后 PTZ 组和 BF839 + PTZ 组小鼠的代表性 EEG 记录。蓝色轨迹指示棘慢波放电。
- (K) PTZ 组和 BF839 + PTZ 组棘波密度的量化 (n = 6/组) (曼-惠特尼检验)。
- (L) PTZ 组与 BF839 + PTZ 组之间 EEG 记录期间棘波持续时间的比较 (n = 6/组) (曼-惠特尼检验)。
- (M - O) 海马树突及树突棘的高尔基染色图像 (M)，以及量化的棘密度 (N) 和棘长度 (O) (每组 6 只小鼠，每只取 10 个视野)。
- (P) 用 rAAV-NCSP-YFP-2E5 标记的海马神经元代表性图像，显示每个树突片的平均棘密度和棘长度 (n = 3/组) (曼-惠特尼检验)。

数据以均值 \pm 标准误表示。n. s.，无显著性；* $p < 0.05$ ， **$p < 0.01$** ，* $p < 0.001$ 。

另见图 S2 和 S3。

为评估 BF839 在 PTZ 诱导癫痫发生过程中的调节作用，我们在 PTZ 点燃的同时给予 BF839，连续 22 天，并纵向监测癫痫发作结果以确定其抗惊厥作用的起始时间 (图 S2A)。值得注意的是，与单独 PTZ 组相比，BF839 处理小鼠的癫痫发作严重程度更早降低 (第 12 天：PTZ: 2.65 ± 0.36 vs. BF839 + PTZ: 1.79 ± 0.24 ; $p = 0.033$)，随后发作频率降低 (第 14 天：PTZ: 3.00 ± 0.00 vs. BF839 + PTZ: 2.00 ± 0.26 ; $p = 0.012$)，表明其在癫痫发生过程中具有渐进性的抑制作用。定量分析进一步证实，BF839 显著降低了 PTZ 组的发作频率 (PTZ: 2.28 ± 0.06 vs. BF839 + PTZ: 1.92 ± 0.06 ; $p = 0.0022$) 和每次发作的严重程度评分 (PTZ: 2.53 ± 0.071 vs. BF839 + PTZ: 1.91 ± 0.045 ; $p = 0.0022$) (图 S2B 和 S2C)。癫痫发作期间的代表性海马 EEG 记录 (图 S2D) 及频谱分析 (图 S2E) 表明，BF839 联合给药显著抑制了 θ 波 (PTZ: $7,995.99 \pm 129.84 \mu V^2$ vs. BF839 + PTZ: $3,947.50 \pm 118.28 \mu V^2$; $p = 0.0022$)、 α 波 (PTZ: $2,666.61 \pm 129.56 \mu V^2$ vs. BF839 + PTZ: $1,468.60 \pm 31.91 \mu V^2$; $p = 0.0022$) 和 β 波 (PTZ: $952.93 \pm 49.57 \mu V^2$ vs. BF839 + PTZ: 383.99 ± 30.78

μV^2 ; $p = 0.0022$) 振荡的功率谱密度。此外, 与 PTZ 组相比, BF839 处理显著降低了 SWD 的棘波密度 (PTZ: 1.99 ± 0.12 vs. BF839 + PTZ: 0.94 ± 0.068 ; $p = 0.0022$) 和持续时间 (PTZ: 715.47 ± 43.32 s vs. BF839 + PTZ: 338.80 ± 24.45 s; $p = 0.0022$) (图 S2F 和 S2G)。总之, 这些发现表明 BF839 在 PTZ 诱导的癫痫发生过程中发挥渐进的抗惊厥作用, 首先缓解发作严重程度, 随后降低发作频率。行为和电生理指标的联合改善提示, 持续给予 BF839 可稳定神经兴奋性, 并可能通过累积的肠-脑轴介导机制来提供癫痫发作保护。

为在慢性癫痫模型中进一步验证 BF839 的持续抑制效应, 我们采用了海人酸诱导的癫痫持续状态小鼠模型 (图 S3A)。在诱导后 12-14 天, BF839 处理显著缩短了癫痫发作持续时间 (KA 组: 306.67 ± 15.58 秒 vs. KA + BF839 组: 241.33 ± 21.04 秒; $p = 0.041$), 并降低了每日发作频率 (KA 组: 2.67 ± 0.21 次 vs. KA + BF839 组: 1.50 ± 0.22 次; $p = 0.026$) (图 S3B)。此外, 这些抗惊厥效应持续存在, 在诱导后 23-25 天, 与 KA 组相比, BF839 处理小鼠仍维持显著更短的发作持续时间 (KA 组: 380.67 ± 15.47 秒 vs. KA + BF839 组: 231.83 ± 17.38 秒; $p = 0.0043$) 和更低的每日发作频率 (KA 组: 3.00 ± 0.26 次 vs. KA + BF839 组: 1.33 ± 0.21 次; $p = 0.0065$) (图 S3C)。癫痫发作期间的海马代表性 EEG 记录见图 S3D, 相应的频谱分析见图 S3E。BF839 处理强力抑制了 δ 频段 (KA 组: $10,720.71 \pm 490.32$ vs. KA + BF839 组: $6,930.12 \pm 428.65$ μV^2 ; $p = 0.0022$)、 θ 频段 (KA 组: $8,005.36 \pm 501.38$ vs. KA + BF839 组: $3,609.97 \pm 188.99$ μV^2 ; $p = 0.0022$)、 α 频段 (KA 组: $2,710.22 \pm 121.86$ vs. KA + BF839 组: $1,424.93 \pm 63.55$ μV^2 ; $p = 0.0022$) 和 β 频段 (KA 组: 860.92 ± 73.62 vs. KA + BF839 组: 338.57 ± 30.42 μV^2 ; $p = 0.0022$) 的功率谱密度。与仅 KA 组小鼠相比, BF839 给药显著降低了 SWD 棘波密度 (KA 组: 1.83 ± 0.046 vs. KA + BF839 组: 0.87 ± 0.07 ; $p = 0.0022$) 并缩短了棘波持续时间 (KA 组: 362.50 ± 12.95 秒 vs. KA + BF839 组: 231.83 ± 20.02 秒; $p = 0.0043$) (图 S3F-S3H), 表明发作期放电强度减弱。为评估 BF839 介导的神经调节的细胞相关性, 我们检测了作为神经元激活标志物的 c-Fos 免疫

反应性。KA 刺激在海马 CA3 区（对照组：32.67 ± 2.46；KA 组：87.33 ± 3.08；KA + BF839 组：43.67 ± 4.28； $p_{\text{对照组-KA}} < 0.001$ ； $p_{\text{KA-(KA+BF839)}} < 0.001$ ）和 DG 区（对照组：27.50 ± 2.86；KA 组：59.83 ± 3.26；KA + BF839 组：38.67 ± 2.19；两次比较均 $p < 0.001$ ）诱导了显著的 c-Fos 表达，但在 CA1 区未见此效应（对照组：117.67 ± 4.22；KA 组：131.33 ± 6.01；KA + BF839 组：118.67 ± 3.36； $p_{\text{对照组-KA}} = 0.129$ ； $p_{\text{KA-(KA+BF839)}} = 0.167$ ）（图 S3I-S3L）。总之，这些结果表明 BF839 在多种慢性癫痫模型中提供了强效且持续的保护作用。

为探究 BF839 在减少癫痫发作中的作用，并确定增强其在肠道内的生态位能否放大其抗癫痫效应，我们使用包括万古霉素、链霉素、新霉素和庆大霉素在内的抗生素处理 3 天以清除肠道微生物群[38]。随后，在 PTZ 诱导癫痫的同时，进行为期 11 天的胃内 BF839 治疗，该治疗持续至实验结束（图 S4A）。经 ABX 清除细菌后，与 PTZ 组相比，ABX 组的每日癫痫发作次数有所减少，但该减少无统计学显著性（图 S4B）。然而，与 PTZ 组和 BF839 组相比，在 ABX 预处理后接受 BF839 治疗的小鼠每日发作频率降低幅度显著更大（图 S4B）。具体而言，ABX 后 BF839 组的平均发作次数（ABX + BF839 + PTZ：0.68 ± 0.085 次 vs. BF839 + PTZ：1.29 ± 0.16 次； $p = 0.0045$ ）和发作总持续时间（ABX + BF839 + PTZ：332.78 ± 36.74 秒 vs. BF839 + PTZ：464.67 ± 42.51 秒； $p < 0.001$ ）均显著低于单独的 BF839 组（图 S4C 和 S4D）。然而，ABX + BF839 + PTZ 组与 BF839 + PTZ 组之间的发作潜伏期无显著差异（696.30 ± 55.76 秒 vs. 494.90 ± 59.86 秒； $p = 0.1008$ ）（图 S4E）。此外，与 BF839 组相比，ABX 后 BF839 组的癫痫发作评分更低（ABX + BF839 + PTZ：1.29 ± 0.059 vs. BF839 + PTZ：1.62 ± 0.08； $p = 0.0028$ ）（图 S4F 和 S4G）。BF839 灌胃对小鼠体重无显著影响（图 S4H）。综上所述，这些发现表明，胃内给予脆弱拟杆菌可降低癫痫模型的发作易感性并改善海马神经元过度兴奋性，这得到了 EEG 频谱特征和树突棘形态恢复的支持。

BF839 的抗癫痫作用由迷走神经介导的肠道-大脑神经信号传导

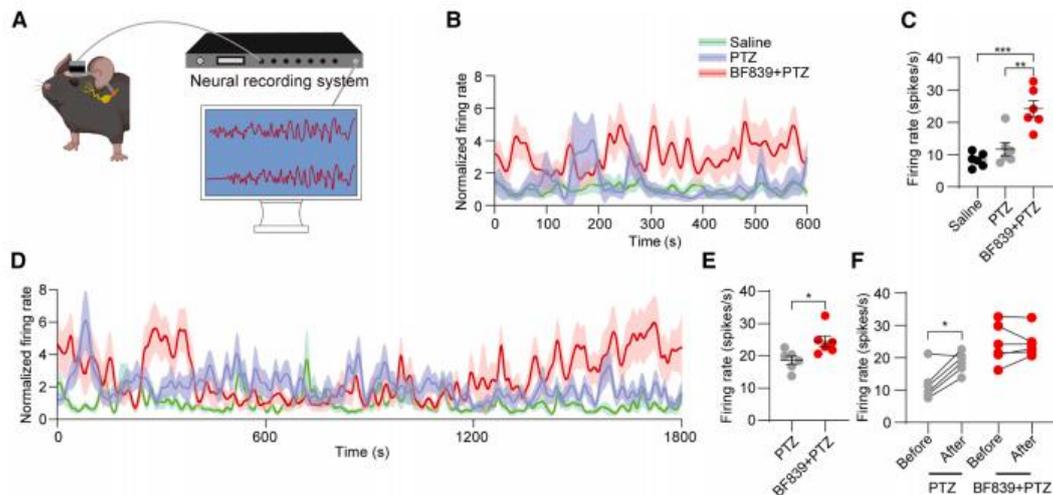
迷走神经在胃肠道与大脑之间传递代谢信号方面起着关键作用[39]。鉴于迷走神经刺激是治疗难治性癫痫的常见临床干预手段，这突显了迷走神经活动与癫

痫之间的紧密联系[40 - 42]。为验证迷走神经活动在 BF839 介导的肠-脑轴抗癫痫作用中的潜在角色,我们通过迷走神经电图记录在清醒小鼠中记录自发性迷走神经活动(图 3A)[43]。为避免运动干扰,还在麻醉小鼠中对结肠机械刺激及 BF839 腔内灌注期间的迷走神经节活动进行了记录和测量(图 S4I-S4K)。在 PTZ 注射前,使用 Apollo 降噪系统记录了所有实验组的迷走神经活动(图 3A)。迷走神经活动如图 3B 所示,放电频率分析显示,与生理盐水组(BF839 + PTZ: 24.23 ± 2.50 vs. 生理盐水组: 8.39 ± 0.89 ; $p < 0.001$)和 PTZ 组(BF839 + PTZ: 24.23 ± 2.50 vs. PTZ 组: 11.71 ± 2.04 ; $p = 0.001$)相比, BF839 处理显著增强了迷走神经活动(图 3C)。PTZ 注射后,与 PTZ 组相比, BF839 处理小鼠在结状(迷走)神经节中仍表现出更高的神经活动(BF839 + PTZ: 24.47 ± 1.71 vs. PTZ 组: 18.66 ± 1.26 ; $p = 0.026$) (图 3D 和 3E)。

对各组内 PTZ 注射前后迷走神经活动的比较显示, PTZ 组活动显著增加,而 BF839 组显示出更温和的升高,这表明 BF839 增强了迷走神经活动,尽管该效应可能在达到某一阈值后趋于稳定(图 3F)。为进一步阐明迷走神经在癫痫发作抑制中的作用,根据先前研究描述,我们使用微袖套电极在 PTZ 注射后刺激迷走神经节(图 3G)[44]。在最后一次 PTZ 注射时,与 PTZ 组(2.83 ± 0.17 次)相比, BF839 + PTZ 组(1.50 ± 0.34 次; $p = 0.0258$)和 VNS + BF839 + PTZ 组(1.33 ± 0.33 次; $p = 0.011$)小鼠的癫痫发作次数显著减少(图 3H)。然而,与 PTZ 组相比,单独 VNS 并未导致发作次数显著减少(VNS + PTZ: 1.67 ± 0.33 次 vs. PTZ 组: 2.83 ± 0.17 次; $p = 0.0581$) (图 3H)。与 PTZ 组(226.50 ± 29.25 秒)相比, BF839 + PTZ 组(537.00 ± 65.69 秒; $p = 0.039$)、VNS + PTZ 组(495.83 ± 71.08 秒; $p = 0.0128$)和 VNS + BF839 + PTZ 组(853 ± 45.34 秒; $p < 0.001$)的癫痫发作潜伏期均显著延长,其中 VNS 与 BF839 联合显示出最长的发作潜伏期(图 3I)。同样,与 PTZ 组(759.50 ± 53.67 秒; $p < 0.001$)、BF839 + PTZ 组(415.17 ± 38.11 秒; $p = 0.0381$)和 VNS + PTZ 组(476.17 ± 53.34 秒; $p = 0.0049$)相比, VNS + BF839 + PTZ 组(223.67 ± 36.90 秒)的癫痫发作持续时间更短(图 3J)。此外,与 PTZ 组(2.72 ± 0.18)相比, VNS + BF839 + PTZ 组的平均癫痫发作评分显著更低(VNS + BF839 + PTZ: 1.11 ± 0.11 ; $p < 0.001$),尽管与 BF839 + PTZ 组(1.33 ± 0.17 ; $p = 0.9039$)和 VNS + PTZ 组(1.42 ± 0.20 ; $p = 0.3946$)相比未发现明显差异(图 3K)。

这些发现表明，虽然急性 VNS 单独使用效果有限，但其与 BF839 联合产生了协同抗癫痫效应，这突显了针对个体迷走神经反应性和微生物定植能力进行优化的个性化益生菌-神经干预在难治性癫痫治疗中的前景。

为在 PTZ 诱导的小鼠模型中进一步验证 VNS 在 BF839 抑制癫痫发作效应中的作用，我们考察了左侧颈迷走神经切断术后 BF839 对癫痫发作严重程度的影响。该手术通过切除并烧灼所有左侧颈部的传入和传出迷走神经纤维，有效阻断了迷走神经传递（图 3L）。结果显示，与未进行 LCV 的小鼠相比，LCV 显著增加了 BF839 处理小鼠的癫痫发作次数（LCV 组： 2.13 ± 0.12 次 vs. 非 LCV 组： 1.25 ± 0.18 次； $p = 0.0027$ ）（图 3M 和 3N）。然而，PTZ 诱导的小鼠无论是否接受 LCV，其发作频率相近（LCV 组： 2.47 ± 0.14 次 vs. 非 LCV 组： 2.03 ± 0.15 次； $p = 0.2438$ ）（图 3M 和 3N）。与未进行 LCV 的小鼠（ 498.20 ± 27.72 秒）相比，LCV 术后 BF839 处理小鼠（ 253.67 ± 15.57 秒； $p < 0.001$ ）和 PTZ 诱导小鼠（ 194.50 ± 21.03 秒； $p = 0.018$ ）的癫痫发作潜伏期均缩短（图 3O）。相比之下，LCV 术后 BF839 处理小鼠的发作持续时间（ 680.11 ± 40.97 秒）较仅 BF839 处理小鼠（ 463.9 ± 48.76 秒； $p = 0.0083$ ）延长，而非 LCV 组（ 746.00 ± 26.72 秒； $p = 0.196$ ）与非 LCV 组（ 613.80 ± 52.08 秒； $p = 0.756$ ）PTZ 诱导小鼠的持续时间无显著差异（图 3P）。此外，LCV 加剧了 BF839 + PTZ 组的癫痫发作严重程度（LCV 组： 2.04 ± 0.10 vs. 非 LCV 组： 1.42 ± 0.07 ； $p < 0.001$ ），而在 PTZ 组中未观察到发作严重程度的显著差异（LCV 组： 2.55 ± 0.12 vs. 非 LCV 组： 2.21 ± 0.11 ； $p = 0.0977$ ）（图 3Q 和 3R）。这些结果表明，LCV 显著削弱了 BF839 的抗惊厥效应，从而突显了迷走神经在 BF839 介导的肠-脑信号通路中的关键作用。



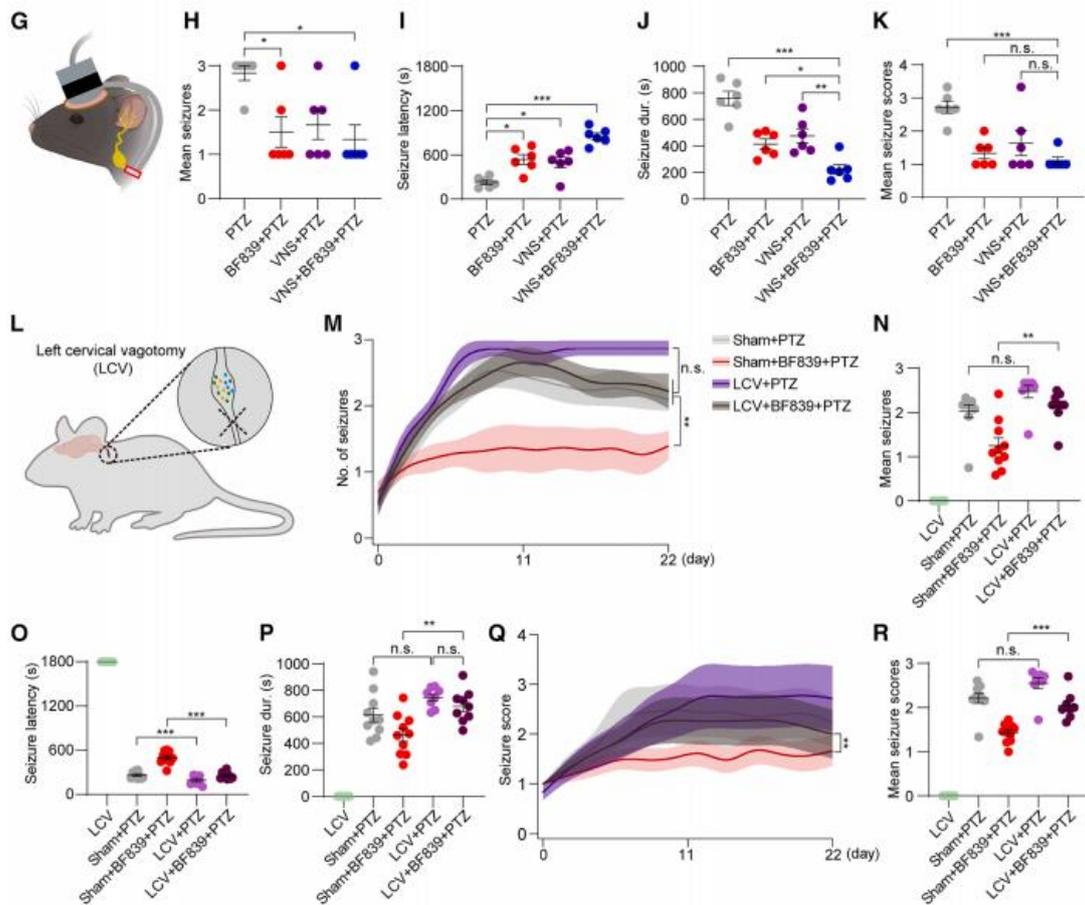


图 3. BF839 通过激活颈段结状神经节增强迷走神经刺激的抗癫痫效应，而单侧迷走神经切断术降低其治疗效果

- (A) 显示小鼠左侧迷走神经电图记录位置的实验示意图。
- (B) 第 12 次 PTZ 注射前左侧迷走神经的电图记录(与生理盐水组相比的标准化平均迷走神经放电频率)。
- (C) PTZ 注射前迷走神经电图记录的放电频率分析 (n = 6/组) (普通单因素方差分析)。
- (D) 癫痫发作期间的迷走神经活动电图记录。
- (E) 癫痫发作期间迷走神经放电频率分析 (n = 6/组) (曼-惠特尼检验)。
- (F) 比较经 BF839 处理和未经处理小鼠在 PTZ 注射前后的迷走神经放电频率 (n = 6/组) (曼-惠特尼检验)。
- (G) 接受迷走神经刺激实验小鼠的示意图。
- (H) 各组在最后一次 PTZ 注射期间观察到的平均癫痫发作次数 (n = 6/组) (普通单因素方差分析)。
- (I) 最后一次 PTZ 注射时的癫痫发作潜伏期 (n = 6/组) (普通单因素方差分析)。
- (J) 最后一次 PTZ 注射时的癫痫发作持续时间 (n = 6/组) (普通单因素方差分析)。

- (K) 各组在最后一次 PTZ 注射期间的平均癫痫发作评分 ($n = 6/\text{组}$) (普通单因素方差分析)。
- (L) 接受左侧颈迷走神经切断术的实验小鼠示意图。
- (M) PTZ 注射后各组每只动物每天的癫痫发作次数 (普通单因素方差分析)。
- (N) PTZ 注射后每只动物每天的平均癫痫发作次数 ($n = 8 - 10/\text{组}$) (普通单因素方差分析)。
- (O) 最后一次 PTZ 注射时的癫痫发作潜伏期 ($n = 8 - 10/\text{组}$) (普通单因素方差分析)。
- (P) 最后一次 PTZ 注射时的癫痫发作持续时间 ($n = 8 - 10/\text{组}$) (普通单因素方差分析)。
- (Q) PTZ 注射后各组每天的癫痫发作评分 ($*p < 0.05$, 普通单因素方差分析)。
- (R) 12 次 PTZ 注射期间每只动物每天的平均癫痫发作评分 ($n = 8 - 10/\text{组}$) (普通单因素方差分析)。数据以均值 \pm 标准误表示。

另见图 S4。

BF839 增强肠道-大脑乙酰胆碱信号传导

基于上述证明神经通路在 BF839 抗癫痫效应的肠-脑轴机制中起关键作用的结果,我们接下来对结肠组织中的神经递质和神经调质进行了靶向代谢组学分析,以鉴定可能与癫痫调节相关的益生菌依赖性神经活性代谢物。定量分析了 40 种神经活性化合物,结果显示 PTZ 组与 BF839 处理组之间存在显著差异(图 4A)。观察到胆碱代谢物的显著改变,提示 BF839 的作用可能涉及对结肠胆碱能神经传递的调节(图 4A 和 4B)。其他与癫痫相关的神经递质,如 4-氨基丁酸 (PTZ: 1.00 ± 0.09 vs. BF839: 1.50 ± 0.19 ; $p = 0.132$) 和谷氨酰胺 (PTZ: 1.00 ± 0.18 vs. BF839 + PTZ: 0.71 ± 0.06 ; $p = 0.309$), 则未显示显著差异(图 S5A 和 S5B)。值得注意的是,与癫痫高度相关并参与肠-脑代谢对话的胆碱水平,在 PTZ 组与 BF839 + PTZ 组之间表现出显著差异 (PTZ: 1 ± 0.18 vs. BF839 + PTZ: 1.94 ± 0.17 ; $p = 0.0043$) (图 4C)。鉴于 BF839 通过迷走神经介导的肠-脑神经信号发挥抗癫痫作用,且先前研究表明肠道胆碱能通路受肠道微生物群调节[23, 47], 我们接下来探究了结肠 ChAT 介导的肠-脑轴是否有助于脆弱拟杆菌的抗癫痫效应。

我们随后评估了 BF839 在 PTZ 模型中如何调节肠道 ChAT 信号。在我们的研究中,PTZ 诱导小鼠结肠中的 ChAT 阳性细胞数量显著低于生理盐水组(PTZ: 23.50 ± 2.29 vs. 生理盐水组: 33.6 ± 2.52 ; $p = 0.04$) (图 4D)。值得注意的是,对 PTZ 诱导小鼠施用 BF839 (49.50 ± 4.36 ; $p = 0.002$) 导致 ChAT 阳性细胞数量显著增加(图 4D),提示在 PTZ 模型中存在肠道 ChAT 代谢的调节。此外,高效液相色谱分析表明,与 PTZ 组相比,BF839 处理小鼠结状神经节中的胆碱水平升高(BF839 + PTZ: 4.70 ± 0.46 vs. PTZ: 1 ± 0.32 ; $p = 0.0043$) (图 4E)。对磷酸化细胞外信号调节激酶的免疫染色显示,与生理盐水组(BF839 + PTZ: 0.078 ± 0.007 , 生理盐水组: 0.059 ± 0.004 ; $p = 0.0156$) 和 PTZ 组(PTZ: 0.062 ± 0.003 ; $p = 0.0156$) 相比,BF839 处理组的激活细胞比例显著更高(图 S5C 和 S5D)。

在确定 BF839 在调节结肠和迷走神经节 ChAT 表达中的作用后,随后的分析探讨了 BF839 是否能够通过肠-脑轴影响海马神经元活性和神经递质水平。采用 HPLC 比较了单独 PTZ 处理或 BF839 与 PTZ 联合处理小鼠海马和血清中关键癫痫相关分子的表达水平。结果表明,与 PTZ 组相比,BF839 处理导致海马中胆碱和 GABA 水平显著升高(胆碱: 1.97 ± 0.19 ; GABA: 1.59 ± 0.11) (胆碱: 1.00 ± 0.12 , $p = 0.0022$; GABA: 1.00 ± 0.07 , $p = 0.0043$),而在血清中未检测到显著变化(图 4F、4G、S5E 和 S5F)。这些发现提示迷走神经在通过肠-脑神经通路介导 BF839 效应中的作用。

BF839 介导的肠-脑信号传导的结构基础: 结肠 ChAT 阳性细胞-结状神经节的连接性

为进一步阐明 BF839 在肠-脑轴内激活的神经信号传导是由 ChAT 特异性介导的,我们研究了肠道内 ChAT 阳性细胞通过迷走神经向大脑传递信号的能力。尽管如先前报道,近端小肠有密集的迷走神经支配,但由于微生物密度沿胃肠道呈明显梯度分布[49, 50],我们将分析重点放在结肠。结肠拥有最高的细菌负荷——包括丰富的共生菌如拟杆菌属和乳杆菌属——并且是宿主-微生物群相互作用的关键部位之一。这种区域特异性支持了微生物信号与迷走神经介导的肠-脑通讯之间存在潜在的机制联系。与此重点一致,主要反映结肠腔内菌群的粪便样本

被用于微生物群分析[51]。我们首先通过重新分析先前工作中已发表的单细胞 RNA 测序数据集,旨在获得小鼠结肠上皮细胞中 ChAT 的全面细胞分布谱[52, 53]。数据显示, ChAT 主要在结肠簇状细胞中表达,这与先前报告一致,即这些细胞专门用于感知腔内信号,呈现神经内分泌特征,并作为胆碱能输出的来源(图 S6A 和 S6B)[47, 54]。通过重新分析现有报告中迷走神经节复合体的单细胞测序数据,我们进一步确定了 NG 神经元中几种 AChRs 的强表达,包括 *Chrm1*、*Chrm2*、*Chrna4*、*Chrnb2*、*Chrnb3*、*Chrna6*、*Chrna5*、*Chrna3* 和 *Chrnb4* (图 S6C)[55]。这些数据表明, BF839 在结肠中引发的 ChAT 特异性信号可以突触性地从结肠上皮传递到迷走神经节,后者作为响应 BF839 的肠-脑神经信号的中继站,尽管结肠本身也显示有多种 AChRs 的局部表达(图 S6D - S6H)。基于这些观察,我们假设 ChAT 阳性簇状细胞,类似于肠道神经足细胞,可能形成从结肠到迷走神经的突触连接[56 - 58],从而使得 BF839 的结肠信号能够通过位于迷走神经上的 AChRs 进行传递(图 4H)。

此外,使用抗 ChAT 和抗 synapsin-1 抗体的共标记实验表明,表达 ChAT 的簇状细胞与突触前蛋白 synapsin-1 共定位(图 4I),证实了结肠中 ChAT 阳性上皮簇状细胞的突触特性。在结肠上皮处对全神经元标志物蛋白基因产物 9.5 和 ChAT 进行的额外共免疫染色进一步佐证了这些结果(图 4J),提示分泌 ChAT 的细胞可能检测益生菌信号并通过迷走神经传递将其传递给大脑。

为进一步阐明肠-脑神经环路并确定结肠中表达 ChAT 的细胞是否与神经系统相关联并将肠道信号传递至中枢神经系统,我们将伪狂犬病毒-巨细胞病毒早期增强子/鸡 β -肌动蛋白-EGFP 注射到结肠近端区域(图 4K),随后进行脑部解剖以追踪荧光信号。我们的观察表明, PRV-CAG-EGFP 信号在孤束核中大量表达(图 4L),证实了 NTS 与结肠之间的神经连接。这意味着益生菌诱导的来自肠道的内脏信号可以通过迷走神经激活 NTS 中的神经元并有效传递到大脑。我们进一步研究了 ChAT 信号通过迷走神经传递的潜在介导,初步调查关注 NG 神经纤维是否投射到结肠并与 ChAT 阳性细胞建立连接。为证实这一点,将 AAV9-Retro-CAG-EGFP 注射到 NG 中(图 4M 和 S6I)。对标记有 AAV9-Retro-CAG-EGFP 的迷走神经纤维进行逆行追踪,随后与结肠中的 ChAT 阳

性细胞共染色，利用 Imaris viewer 软件进行了详细的三维重建分析（图 4M；视频 S1）。该分析显示，迷走神经感觉纤维与结肠中的 ChAT 阳性细胞彼此距离很近，这表明投射到结肠的 NG 可能与 ChAT 阳性细胞建立了重要连接，以感知和传递来自 BF839 的各种刺激信号。

化学遗传学操控鉴定出介导 BF839 诱导的癫痫抑制的结肠 ChAT 阳性细胞-NG 环路

为直接测试从结肠细胞到 NG 的胆碱能信号传导是否有助于 BF839 介导的癫痫保护，我们采用了一种组合病毒策略来选择性地追踪和操控结肠 ChAT 阳性细胞-迷走神经传入环路（图 5A 和 5B）。通过向左颈迷走神经干共注射 RV-EnvA- Δ G-mCherry-Cre 与辅助病毒（AAV-hSyn-TVA 和 AAV-hSyn-N2cG）实现逆行标记，同时用 Cre 依赖性兴奋性 DREADD、促凋亡构建体或对照载体转导结肠 ChAT 阳性细胞。该方法能够同时实现结肠 ChAT 阳性细胞向 NG 投射的解剖学定义和功能扰动。通过结合 AAV 和狂犬病病毒载体的逆行追踪与 ChAT 免疫荧光共标记，我们发现了结肠 ChAT 阳性细胞与逆行标记的 NG 神经元之间的共定位，从而确认了从结肠 ChAT 阳性细胞到 NG 的直接神经信号通路（图 5C）。定量分析进一步表明，AAV 转导的神经元胞体占肠道 ChAT 阳性细胞总数的 $29.22\% \pm 7.60\%$ （图 5C）。在 PTZ 癫痫模型中，给予去氯氯氮平后，化学遗传学激活结肠 ChAT 阳性细胞显著降低了癫痫发作频率（hM3Dq + PTZ: 1.67 ± 0.15 次 vs. EGFP + PTZ: 2.83 ± 0.11 次; $p = 0.005$ ）。相反，消融这些神经元则显著削弱了 BF839 的保护效应（taCasp3 + BF839 + PTZ: 2.94 ± 0.06 次 vs. EGFP + BF839 + PTZ: 1.33 ± 0.38 次; $p < 0.001$ ）（图 5D）。虽然单独激活即可重现 BF839 的效应，但 BF839 与化学遗传学激活联合产生了发作严重程度的协同降低（hM3Dq + BF839 + PTZ: 1.53 ± 0.13 vs. BF839 + PTZ: 2.35 ± 0.16 ; $p < 0.001$ ）（图 5E）。这些数据确立了结肠 ChAT 阳性细胞→NG 投射在介导 BF839 抗癫痫作用中的**充分性和必要性**。电生理记录进一步表明，迷走神经放电频率可被 BF839（hM3Dq + BF839 + PTZ: 11.90 ± 0.42 Hz vs. BF839 + PTZ: 6.44 ± 0.15 Hz; $p < 0.001$ ）或 ChAT 阳性细胞激活（hM3Dq + BF839 + PTZ: 11.90 ± 0.42 Hz vs. hM3Dq + PTZ: 10.42 ± 0.30 Hz; $p = 0.008$ ）增强，并且当两种干预结合时最为显著（图

5F)。消融 ChAT 阳性细胞则消除了 BF839 诱导的迷走神经激活 (taCasp3 + BF839 + PTZ: 3.75 ± 0.14 Hz vs. BF839 + PTZ: 6.44 ± 0.15 Hz; $p < 0.001$) (图 5F)。为确定结肠神经激活或消融本身是否影响基线迷走神经活性,我们在给予 PTZ 和 DCZ 之前记录了 NG 放电频率。与对照组相比, taCasp3 组的基线放电频率显著降低 (taCasp3: 3.57 ± 0.12 Hz vs. 对照: 4.50 ± 0.24 Hz, $p = 0.023$), 而 hM3Dq 组未显示显著差异 (4.12 ± 0.27 Hz, $p = 0.47$) (图 S7A 和 S7B)。一致地, c-Fos 图谱显示, 在给予 BF839 或激活 ChAT 阳性细胞后, NTS 的内侧和中间亚区的神经元活动增加, 且在两者结合时观察到协同增强——这些区域被认为是迷走神经输入的关键枢纽[60] (So1M: EGFP + BF839 + PTZ, 28.00 ± 1.46 个; hM3Dq + PTZ, 30.00 ± 1.69 个; hM3Dq + BF839 + PTZ, 41.17 ± 0.87 个; $p_{(EGFP + BF839 + PTZ)-(hM3Dq + BF839 + PTZ)} < 0.001$; $p_{(hM3Dq + PTZ)-(hM3Dq + BF839 + PTZ)} < 0.001$; So1IM: EGFP + BF839 + PTZ, 26.50 ± 1.31 个; hM3Dq + PTZ, 30.33 ± 1.72 个; hM3Dq + BF839 + PTZ, 39.67 ± 1.54 个; $p_{(EGFP + BF839 + PTZ)-(hM3Dq + BF839 + PTZ)} < 0.001$; $p_{(hM3Dq + PTZ)-(hM3Dq + BF839 + PTZ)} < 0.001$) (图 5G 和 5H)。相比之下, 背外侧亚区未观察到显著变化 (图 5H)。重要的是, 在典型的癫痫灶海马区——CA3 区和 DG 区——的神经元活动被任一干预措施强力抑制, 并且在联合组中观察到最强的抑制效果 (CA3 区: EGFP + BF839 + PTZ: 41.50 ± 1.18 个或 hM3Dq + PTZ: 43.17 ± 1.42 个 vs. hM3Dq + BF839 + PTZ: 25.70 ± 1.30 个; $p_{(EGFP + BF839 + PTZ)-(hM3Dq + BF839 + PTZ)} < 0.001$; $p_{(hM3Dq + PTZ)-(hM3Dq + BF839 + PTZ)} < 0.001$; DG 区: EGFP + BF839 + PTZ: 35.83 ± 2.15 个或 hM3Dq + PTZ: 38.50 ± 2.28 个 vs. hM3Dq + BF839 + PTZ: 16.83 ± 1.82 个; $p_{(EGFP + BF839 + PTZ)-(hM3Dq + BF839 + PTZ)} < 0.001$; $p_{(hM3Dq + PTZ)-(hM3Dq + BF839 + PTZ)} < 0.001$) (图 5I 和 5J)。总之, 这些结果提供了直接的环路水平证据, 证明结肠 ChAT 阳性细胞介导 BF839 诱导的胆碱能信号通过迷走神经传递至 NTS, 从而减轻海马过度兴奋性并减少癫痫发作活动。这确立了结肠 ChAT 阳性细胞-迷走神经传入通路作为 BF839 发挥癫痫保护作用中肠-脑信号传导的关键通路。

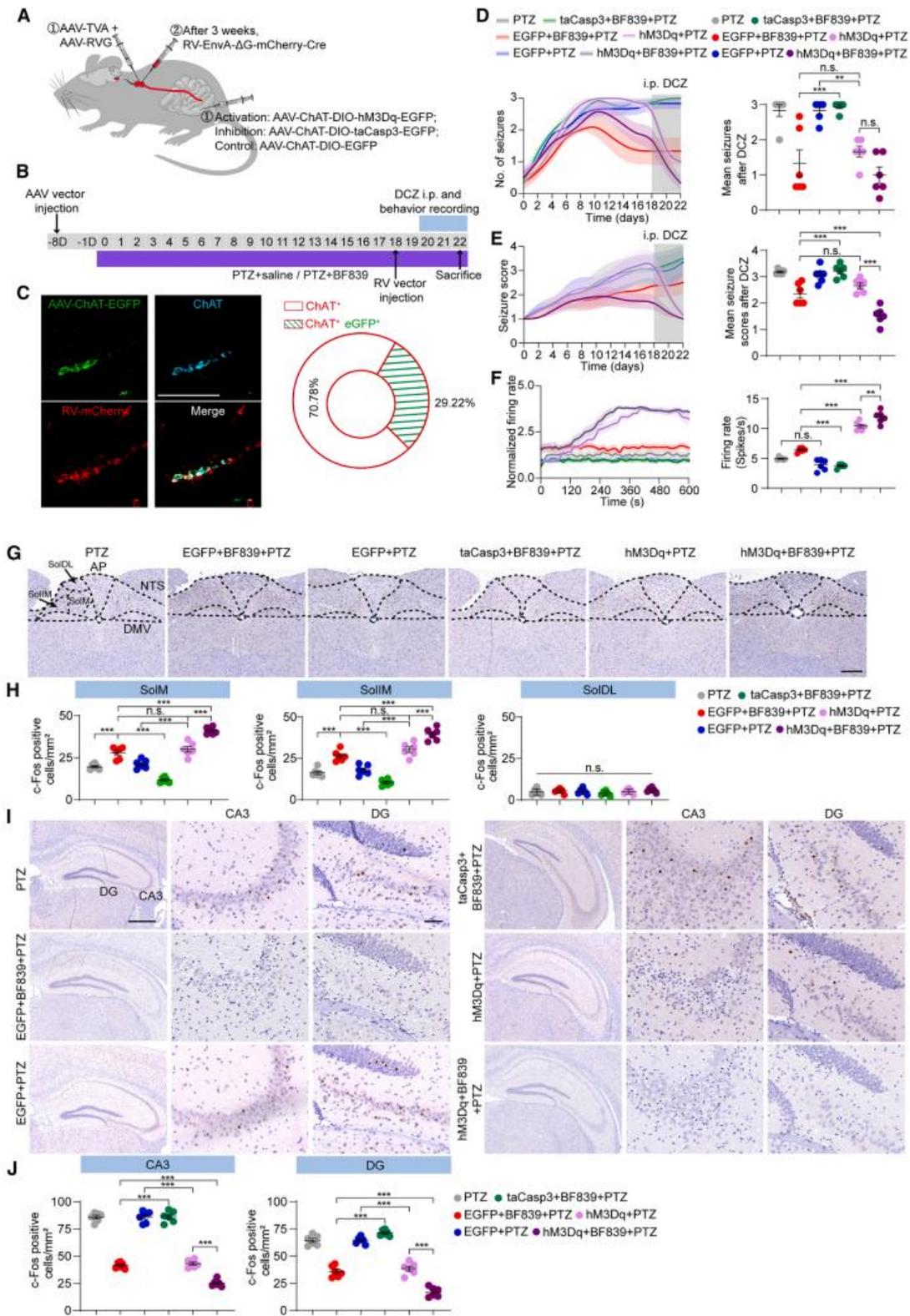


图 5. 激活肠道-迷走神经胆碱能通路抑制癫痫发作并降低海马神经元兴奋性

(A) 实验设计示意图。

(B) 实验时间线。

(C) 结肠区域的逆行病毒追踪结合 ChAT 免疫荧光。使用 Cre 依赖性的 ChAT-EGFP (绿色)

和 RV-EnvA- Δ G-mCherry-Cre (红色) 表达, 连同 ChAT 抗体荧光 (青色), 以鉴定胆碱能细胞及其投射。定量分析显示, AAV 阳性/ChAT 阳性神经元占总 ChAT 阳性神经元群体的 29.2% \pm 7.6% (n = 3 只小鼠)。比例尺: 50 μ m。

(D) 12 次 PTZ 注射后, 每只动物每天的癫痫发作频率 (左图) 及各组平均每日癫痫发作频率 (右图) (n = 6/组)。

(E) 12 次 PTZ 注射后, 每天的癫痫发作严重程度评分 (左图) 及各组平均癫痫发作评分 (右图) (n = 6/组)。

(F) 注射 DCZ 后左侧迷走神经的电图记录 (相对于生理盐水的标准化平均放电频率) 以及癫痫发作期间迷走神经放电分析 (普通单因素方差分析)。

(G) PTZ 处理小鼠孤束核的代表性切片, 经 c-Fos 标记 (n = 6/组)。棕色点状信号代表 c-Fos 活性。比例尺: 200 μ m。

(H) SolM、SolIM 和 SolDL 亚区每单位面积 c-Fos 阳性细胞定量 (n = 6/组; 普通单因素方差分析)。

(I) PTZ 处理小鼠海马的代表性切片, 经 c-Fos 标记 (n = 6/组)。比例尺: 500 μ m。插图显示 CA3 和 DG 区域的放大图像。棕色点状信号代表 c-Fos 活性 (比例尺: 50 μ m)。

(J) CA3 和 DG 区域每单位面积 c-Fos 阳性细胞定量 (n = 6/组; 普通单因素方差分析)。数据以均值 \pm 标准误表示。**p < 0.01, ***p < 0.001, n. s., 无显著性 (p > 0.05)。另见图 S7。

接下来, 我们旨在对乙酰胆碱信号介导的迷走神经肠-脑轴进行功能验证。使用迷走神经电图记录来评估麻醉小鼠结肠内灌注 ACh 或 BF839 是否能引发迷走神经反应 (图 S7C)。为尽量减少异氟烷对迷走神经活动的潜在干扰影响, 所有记录均在标准化麻醉方案下进行, 整个过程使用 1.75% 异氟烷与 100% 氧气 [61]。数据显示, 在灌注后 120-180 秒的时间窗内, 与生理盐水相比, ACh 和 BF839 均显著提高了迷走神经总放电频率 (ACh: 5.09 \pm 0.11 Hz vs. 生理盐水: 4.02 \pm 0.08 Hz; p = 0.002) (BF839: 5.70 \pm 0.20 Hz vs. 生理盐水: 4.02 \pm 0.08 Hz; p < 0.001) (图 S7D 和 S7E)。值得注意的是, 灌注后观察到迷走神经放电频率下降, 但模式不同: ACh 导致更急剧的下降, 而 BF839 则表现出更平缓的

降低（图 S7D）。统计分析进一步证实，在 ACh 和 BF839 灌注停止后（即 180 秒后），相对于生理盐水组，迷走神经放电频率的显著差异仍然存在，且 ACh 组与 BF839 组之间存在明显区别（ACh: 4.34 ± 0.10 Hz vs. BF839: 5.40 ± 0.21 Hz; $p = 0.0089$ ）（图 S7F）。这些结果表明，ACh 和 BF839 都能通过肠道-迷走神经轴向中枢神经系统传递信号，且与 ACh 相比，BF839 显示出对迷走神经更持久的激活。

我们进一步检验了肠道内灌注烟碱型 AChR 拮抗剂美加明对迷走神经活动和 BF839 抗癫痫效应的影响。结果显示，在向结肠灌注 ACh 后的 120-180 秒时间窗内，迷走神经放电频率显著增加（图 S7G）。随后，在 180-240 秒期间给予 MEC，导致迷走神经放电频率显著降低（图 S7G）。与生理盐水处理的 ACh 组相比，MEC 处理的 ACh 组表现出相似的迷走神经放电总水平（ACh + 生理盐水: 5.27 ± 0.11 Hz vs. ACh + MEC: 4.77 ± 0.13 Hz; $p = 0.0744$ ），但特别是在 180-240 秒期间，与 ACh + 生理盐水组相比，其迷走神经放电出现显著降低（ACh + 生理盐水: 6.70 ± 0.19 Hz vs. ACh + MEC: 4.29 ± 0.08 Hz; $p < 0.001$ ）（图 S7H 和 S7I）。重要的是，在没有 ACh 的情况下单独给予 MEC，并未显著改变基线神经元放电频率，表明观察到的抑制效应是 ACh 诱发活动所特有的（图 S7H 和 S7I）。这些结果提供了有力证据，证明 ACh 通过肠道中的烟碱型 AChR 传递信号，并通过迷走神经将这些信号传递到大脑。当在 BF839 之后给予 MEC 时，观察到了类似的实验结果（图 S7J）。具体而言，与生理盐水处理的 BF839 组相比，BF839 + MEC 组的迷走神经放电频率显著降低（BF839 + 生理盐水: 5.51 ± 0.13 Hz vs. BF839 + MEC: 4.55 ± 0.042 Hz; $p = 0.001$ ），特别是在 MEC 给药后的 180-240 秒期间（BF839 + 生理盐水: 5.62 ± 0.12 Hz vs. BF839 + MEC: 4.18 ± 0.033 Hz; $p < 0.001$ ）（图 S7K 和 S7L）。这些观察结果进一步支持了 ACh 和 BF839 都通过激活烟碱型 AChR 来调节迷走神经活动的假说。总的来说，这些结果表明，BF839 可能通过提升结肠簇状细胞中 ACh 的表达，从而增强 ChAT 介导的迷走神经向大脑的信号传导。这一信号传导可能有助于抗癫痫神经信号的传递，并通过特异性激活 AChR 发挥抗癫痫作用。

为进一步验证 BF839 的抗癫痫作用是否依赖于胆碱能信号通路，我们进行了

一项研究,考察通过腹腔注射或口服灌胃给予美加明对 BF839 在 小鼠中抗癫痫功效的影响。小鼠的处理流程与先前实验相同。在 PTZ 注射的第 22 天,于给予 BF839 10 分钟后,通过胃内给予小鼠 3 mg/kg 剂量的 MEC。随后记录其行为 30 分钟以进行癫痫行为学评估。该实验研究的结果表明,与单独使用 BF839 处理的小鼠相比,经 MEC 处理的小鼠在 PTZ 诱导下表现出明显的癫痫行为恶化。结果显示,MEC 显著增加了 BF839 处理小鼠的癫痫发作次数(BF839 + PTZ: 1.33 ± 0.21 次 vs. BF839 + MEC + PTZ: 2.50 ± 0.34 次; p = 0.0071) (图 S7M)。与单独 BF839 组相比,BF839 处理小鼠在给予 MEC 后癫痫发作潜伏期也缩短(BF839 + PTZ: 573.83 ± 23.44 秒 vs. BF839 + MEC + PTZ: 307.83 ± 23.21 秒; p < 0.001) (图 S7N)。相比之下,与单独 BF839 组相比,BF839 处理小鼠在给予 MEC 后癫痫发作持续时间延长(BF839 + PTZ: 434.33 ± 29.13 秒 vs. BF839 + MEC + PTZ: 695.67 ± 45.02 秒; p < 0.001) (图 S7O)。MEC 给药也加剧了所有 BF839 处理组的癫痫发作严重程度(BF839 + PTZ: 1.42 ± 0.20 vs. BF839 + MEC + PTZ: 2.28 ± 0.13; p = 0.0057) (图 S7P)。这些综合发现强烈提示,BF839 的抗癫痫作用可能是通过其调节从肠道到大脑经由 NG 的乙酰胆碱能迷走神经信号所介导的,而 MEC 通过阻断这些受体,逆转了 BF839 的治疗功效。

脆弱拟杆菌的抗癫痫效应与乳酸杆菌的肠道定植相关

如前所述结果所证明,在 PTZ 诱导的小鼠模型中,BF839 处理减轻了癫痫发作活动。经过 22 天的干预后,BF839 组小鼠表现出显著更少的癫痫发作次数(BF839 + PTZ: 1.44 ± 0.17 次 vs. PTZ: 2.10 ± 0.07 次; p = 0.0011)、更长的发作潜伏期(BF839 + PTZ: 463.07 ± 49.34 秒 vs. PTZ: 252.73 ± 19.69 秒; p = 0.0068)以及更短的发作持续时间(BF839 + PTZ: 387 ± 48.62 秒 vs. PTZ: 565.67 ± 41.99 秒; p = 0.00996) (图 6A、6B 和 S8A)。然而,BF839 的抗癫痫疗效表现出显著的个体间差异,因此将 BF839 处理小鼠分为有效组和无效组(图 6A、6B 和 S8A)。与“BF839 无效”组小鼠相比,“BF839 有效”组小鼠的癫痫发作发生率(BF839 有效组: 0.96 ± 0.09 次 vs. BF839 无效组: 2.15 ± 0.07 次; p < 0.001)和癫痫发作评分(BF839 有效组: 1.43 ± 0.07 vs. BF839 无效组: 2.12 ± 0.06; p < 0.001)均显著更低(图 S8B 和 S8C)。为深入探究导致 PTZ 处理幼鼠中 BF839 疗效个体差异的潜在因素,我们通过对所有实验组

粪便样本进行 16S rRNA 测序，分析了肠道微生物群组成的变化。与先前研究结果一致[62]，实验小鼠的肠道微生物群以拟杆菌门和厚壁菌门为主（图 6C）。基于加权 UniFrac 距离的主坐标分析证实，PTZ 处理诱导了细菌群落组成的显著改变（图 6D）。值得注意的是，胃内给予 BF839 导致拟杆菌属（BF839 + PTZ: 0.05 ± 0.009 vs. PTZ: 0.009 ± 0.001 ; $p = 0.0024$ ）和乳杆菌属（BF839 + PTZ: 0.033 ± 0.008 vs. PTZ: 0.01 ± 0.001 ; $p < 0.001$ ）的相对丰度大幅增加（图 6E - 6G）。 α 多样性测量表明，BF839 增加了肠道微生物群多样性（BF839 + PTZ: 6.33 ± 0.11 vs. PTZ: 5.94 ± 0.11 ; $p = 0.0253$ ）（图 6H）。使用 MRS 琼脂在 37°C 下培养的进一步验证表明，经过 22 天处理后，BF839 处理小鼠的粪便样本中乳酸杆菌的数量显著高于 PTZ 组（BF839 + PTZ: $67,333.33 \pm 8,871.93$ CFU/g vs. PTZ: $17,500 \pm 3,211.96$ CFU/g; $p = 0.008$ ）（图 S8D 和 S8E）。这些结果与肠道微生物群组成的测序数据相符。对有效组与无效组微生物群组成的比较分析显示，两组之间的肠道微生物群结构存在显著差异（图 S8F 和 S8G）。然而，两组之间的肠道微生物群 α 多样性未观察到显著差异（BF839 + PTZ: 6.05 ± 0.14 vs. PTZ: 5.85 ± 0.27 ; $p = 0.4559$ ）（图 S8H）。与 BF839 无效组相比，BF839 有效组小鼠粪便中拟杆菌属和乳杆菌属的相对丰度均表现出更高的水平（拟杆菌属，BF839 无效组: 0.02 ± 0.003 vs. BF839 有效组: 0.07 ± 0.01 ; $p = 0.028$ ）（乳杆菌属，BF839 无效组: 0.047 ± 0.011 vs. BF839 有效组: 0.02 ± 0.0059 ; $p = 0.026$ ）（图 6I 和 6J）。有趣的是，斯皮尔曼相关分析显示，拟杆菌属与乳杆菌属的相对丰度呈正相关（图 6K）。相反，拟杆菌属和乳杆菌属的相对丰度与平均癫痫发作次数呈负相关（图 6L 和 6M）。这表明乳杆菌在宿主肠道内的生态位可能是 BF839 抗癫痫疗效的决定性因素。值得注意的是，乳杆菌的相对丰度与结肠中 ChAT 阳性细胞数量呈正相关（图 6N）。乳杆菌的相对丰度与记录的小鼠迷走神经节放电频率也呈正相关（图 6O），这突显了这些微生物类群在通过激活肠-脑胆碱能信号传导介导 BF839 抗癫痫效应中的潜在相互作用。

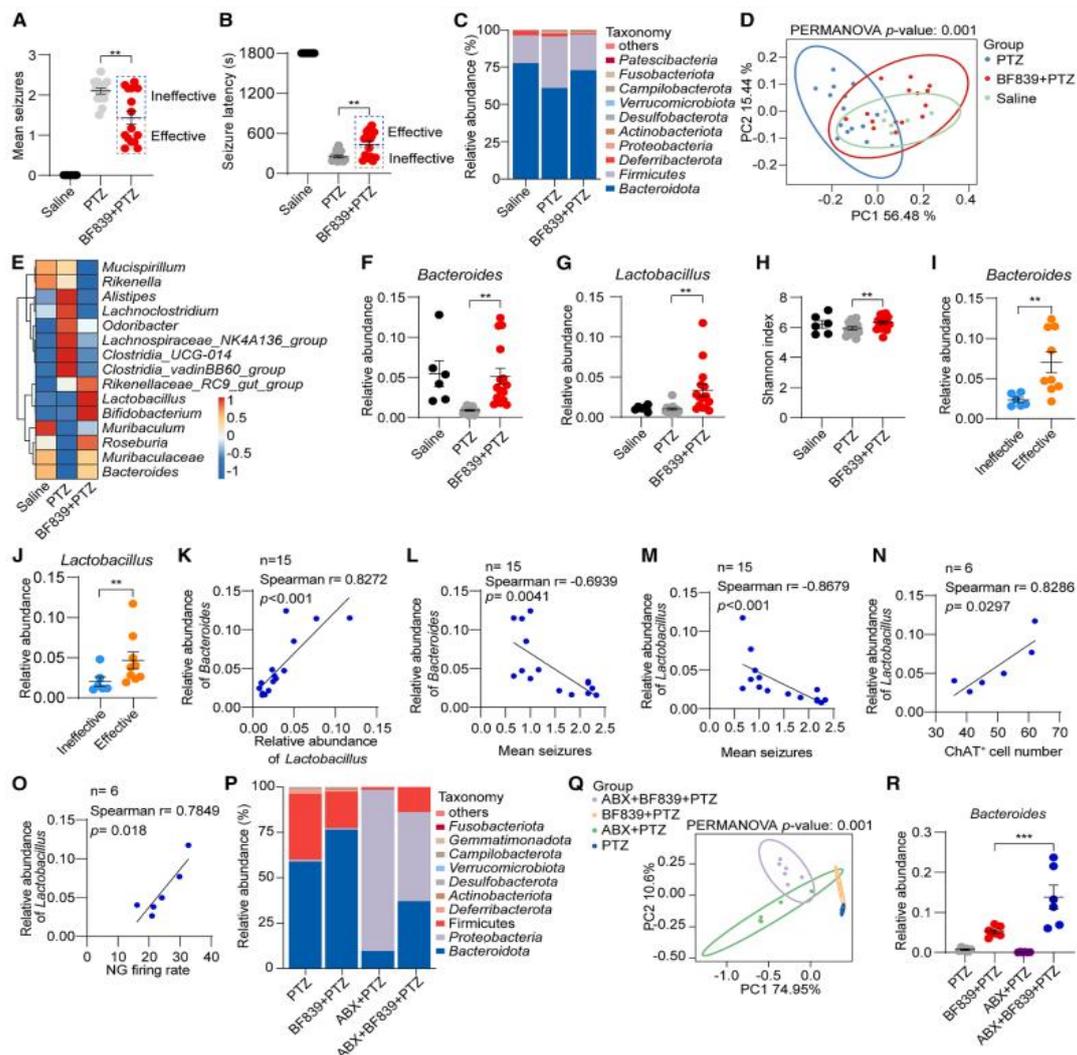
这些发现强调了胃内给予 BF839 与 PTZ 诱导的癫痫小鼠癫痫发作减少之间的关联，并提示这些效应与乳酸杆菌的定植相关，而乳酸杆菌可能有助于维持宿主肠道微生物稳态。我们接下来试图研究，在 BF839 治疗前使用抗生素以增强拟杆

菌属在肠道内的生态位，是否同样有助于乳酸杆菌的定植（这可能参与了 BF839 的抗癫痫效应）。为此，我们检测了经 ABX 和 BF839 处理后不同组别小鼠的肠道微生物群组成。与未经 ABX 处理的小鼠相比，ABX 给药导致了门水平上肠道微生物群组成的改变（图 6P 和 6Q）。特别是，与仅用 BF839 处理的小鼠相比，在 ABX 处理后给予 BF839，不仅导致拟杆菌属丰度显著增加（ABX + BF839 + PTZ: 0.14 ± 0.03 vs. BF839 + PTZ: 0.053 ± 0.005 ; $p < 0.001$ ），而且乳酸杆菌丰度也显著增加（ABX + BF839 + PTZ: 0.12 ± 0.014 vs. BF839 + PTZ: 0.033 ± 0.004 ; $p = 0.0043$ ）（图 6R 和 6S）。

由上皮细胞构成的肠道屏障物理完整性，对于维持肠道微生物群的稳态至关重要，反之亦然。随后，我们通过免疫染色检测小鼠结肠组织中的紧密连接蛋白，分析了 BF839 对肠道屏障完整性的影响。与生理盐水组相比，PTZ 处理小鼠的 ZO-1 阳性细胞数量及 ZO-1 的相对荧光强度均显著降低（ZO-1 细胞数量，PTZ: 22.50 ± 2.32 个 vs. BF839 + PTZ: 69.83 ± 3.09 个; $p = 0.0146$ ）（荧光强度，PTZ: 0.52 ± 0.061 vs. BF839 + PTZ: 0.88 ± 0.041 ; $p = 0.002$ ）（图 S9A）。此外，与单独 PTZ 组小鼠相比，BF839 给药导致 occludin 阳性细胞面积（PTZ: 1.62 ± 0.16 vs. BF839 + PTZ: 3.83 ± 0.34 ; $p < 0.001$ ）和 occludin 相对荧光强度（PTZ: 0.55 ± 0.043 vs. BF839 + PTZ: 0.94 ± 0.082 ; $p = 0.0409$ ）显著增加（图 S9A）。我们还评估了在 BF839 和 ABX 处理存在下，通过 ZO-1 和 occludin 免疫染色检测的肠道屏障完整性。与 PTZ 组相比，ABX 预处理导致结肠中 ZO-1（ABX + BF839 + PTZ: 70.00 ± 2.02 vs. PTZ: 17.00 ± 1.62 ; $p < 0.001$ ）和 occludin（ABX + BF839 + PTZ: 3.68 ± 0.23 vs. PTZ: 1.78 ± 0.14 ; $p < 0.001$ ）表达显著升高（图 S9B），从而表明 BF839 在保护肠道屏障完整性和维持肠道微生物群稳态方面发挥作用。综上所述，这些结果表明 BF839 通过改善 PTZ 诱导的菌群失调和肠黏膜屏障损伤来发挥保护作用。

为进一步阐明脆弱拟杆菌促进乳酸杆菌生长的机制，我们在 MRS 选择性培养基上，利用从 BF839 处理小鼠粪便中分离的罗伊氏乳杆菌菌株（通过 16S rRNA 测序鉴定，表 S4）进行了厌氧共培养实验，以便直接评估它们的共生相互作用（图 6T）。光密度值所示结果表明，当与 BF839 共培养时，罗伊氏乳杆菌丰度

增加，提示 BF839 的代谢副产物可能刺激罗伊氏乳杆菌生长（图 6T）。为在体内验证脆弱拟杆菌对乳酸杆菌定植的这种促进作用，我们通过灌胃给予小鼠 BF839、罗伊氏乳杆菌或 BF839 与罗伊氏乳杆菌的混合物，连续 5 天（图 S10A）。收集粪便并匀浆，离心后取上清进行稀释和涂板。结果显示，与单独给予罗伊氏乳杆菌相比，灌胃给予 BF839 和罗伊氏乳杆菌的混合物显著增加了小鼠粪便中罗伊氏乳杆菌的水平（罗伊氏乳杆菌组：30,000 ± 2,966.47 CFU/g vs. 罗伊氏乳杆菌 + BF839 组：59,833.33 ± 3,978.41 CFU/g; $p = 0.0011$; 图 S10B）。为证实 BF839 对罗伊氏乳杆菌的促生长效应，我们采用了 BF839 与罗伊氏乳杆菌的混合物或大肠杆菌与罗伊氏乳杆菌的混合物，将它们接种到补充了 0.5% 酵母提取物的苛养厌氧营养平板上以评估其生长状态。连续 7 天每日观察菌落生长发现，罗伊氏乳杆菌与 BF839 之间存在共培养现象，菌落彼此邻近生长，而罗伊氏乳杆菌与大肠杆菌之间未出现此现象（图 S10C 和 S10D）。



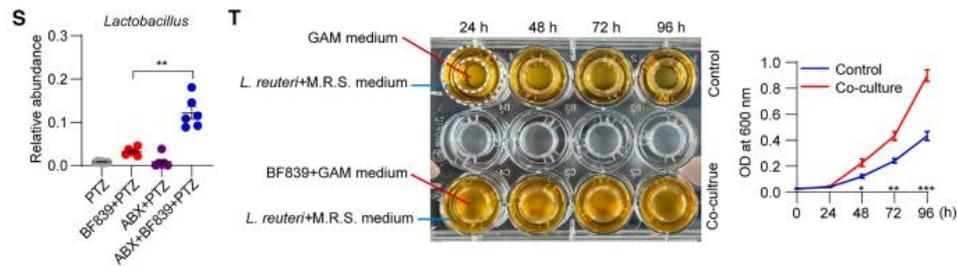


图 6. BF839 抗癫痫效应的亚组差异与乳酸杆菌丰度相关

(A) 12 次 PTZ 注射后，每只动物每天的平均癫痫发作总次数（生理盐水组， $n = 6$ ；PTZ 组和 BF839 组， $n = 15$ ）（非配对 t 检验）。

(B) 最后一次 PTZ 注射后的癫痫发作潜伏期（生理盐水组， $n = 6$ ；PTZ 组和 BF839 组， $n = 15$ ）（曼-惠特尼检验）。

(C) 生理盐水组（ $n = 6$ ）、PTZ 组（ $n = 15$ ）和 BF839 + PTZ 组（ $n = 15$ ）在门水平上的微生物群组成。

(D) 基于加权 UniFrac 矩阵，在 PTZ 诱导后第 22 天对各组在属水平上肠道微生物群组成进行的主坐标分析（生理盐水组， $n = 6$ ；PTZ 组和 BF839 组， $n = 15$ ），如图 2A 所述。

(E) 各处理组（BF839 + PTZ 组、BF839 组和生理盐水组）前 15 个细菌属相对丰度的层次聚类。颜色梯度反映每个分类单元的相对丰度，已针对其在其各处理组中的最小值进行标准化（BF839 + PTZ 组、BF839 组和生理盐水组）。蓝色表示相对于此基线丰度较低，红色表示丰度较高。

(F) 拟杆菌属的相对丰度（生理盐水组， $n = 6$ ；PTZ 组和 BF839 组， $n = 15$ ）（曼-惠特尼检验）。

(G) 乳杆菌属的相对丰度（生理盐水组， $n = 6$ ；PTZ 组和 BF839 组， $n = 15$ ）（曼-惠特尼检验）。

(H) 分组数据的香农 α 多样性指数（生理盐水组， $n = 6$ ；PTZ 组和 BF839 组， $n = 15$ ）（非配对 t 检验）。

(I) 对 BF839 治疗显示有效与无效反应的个体间拟杆菌属丰度差异（无效组， $n = 6$ ；有效组， $n = 9$ ）（曼-惠特尼检验）。

(J) 对 BF839 治疗显示有效与无效反应的个体间乳杆菌属丰度差异（无效组， $n = 6$ ；有效组， $n = 9$ ）（曼-惠特尼检验）。

(K) 拟杆菌属与乳杆菌属相对丰度之间的正相关关系。

(L) 拟杆菌属丰度与平均癫痫发作频率之间的负相关关系。

- (M) 乳杆菌属丰度与平均癫痫发作频率之间的负相关关系。
 - (N) 乳杆菌属丰度与结肠中 ChAT 阳性细胞数量之间的正相关关系。
 - (O) 乳杆菌属丰度与迷走神经放电频率之间的正相关关系。
 - (P) 各组在门水平上的微生物群组成 (n = 6/组), 如图 2M 所述。
 - (Q) 基于加权 UniFrac 矩阵, 在 PTZ 诱导后第 22 天对各组在属水平上肠道微生物群组成进行的主坐标分析 (n = 6/组)。
 - (R) 各组中拟杆菌属 (左) 和乳杆菌属 (右) 的相对丰度 (n = 6/组) (普通单因素方差分析)。
 - (S) BF839 与罗伊氏乳杆菌共培养的代表性图像 (n = 6/组)。
 - (T) 不同时间点测得的光密度值 (n = 3/组) (曼-惠特尼检验)。
- 另见图 S8 - S11 及表 S4。

为探究拟杆菌属促进乳酸杆菌生长和肠道定植的机制, 我们使用了微生物群落代谢建模 (MICOM) ——一种基于约束条件的微生物群落建模方法——来重建 PTZ 处理或 BF839 + PTZ 处理小鼠的肠道微生物模型 [63]。模拟结果显示, 与单独 PTZ 组相比, BF839 干预显著增加了输送给乳酸杆菌的代谢物的相对通量 (图 S10E)。这些发现提示, 在 BF839 处理小鼠中, 富含拟杆菌属的微生物群落创造了一个有利于乳酸杆菌生长和定植的代谢环境。对拟杆菌属来源代谢物的 KEGG 通路分析揭示了在 BF839 处理群落中相对水平升高的几种对乳酸杆菌增殖重要的代谢物。值得注意的是, 拟杆菌属贡献了 L-半胱氨酸和甘氨酸的相对丰度增加——这两种氨基酸对许多乳酸杆菌物种的生长至关重要 (图 S11A) [64, 65]。此外, 包括 L-苹果酸、L-天冬氨酸、磷酸氢盐、乙酸和 L-乳酸盐在内的代谢物, 预计可通过输入丙酮酸和乙酰辅酶 A 的生物合成途径来支持乳酸杆菌的能量代谢 (图 S11A 和 S11B) [66]。这些代谢物在糖酵解和氨基酸代谢中起核心作用, 最终促进细菌增殖和定植 (图 S11B)。综上所述, 这些结果表明, BF839 诱导的肠道微生物群调节增强了支持乳酸杆菌生长的代谢物的可利用性, 从而促进了其在结肠中的扩增。这种代谢转变可能有助于 BF839 处理后观察到的抗癫痫效应。总之, 这些发现强调, 增强肠道内拟杆菌属和乳酸杆菌的生态位能显著提升

BF839 的抗癫痫疗效。

脆弱拟杆菌在儿童难治性癫痫中的治疗效果

基于动物研究显示 BF839 治疗可增加结肠中乳酸杆菌的丰度，我们开展了一项人体验证研究，以探究 BF839 是否在难治性癫痫患儿的肠道中具有增加乳酸杆菌丰度的可比能力。为评估在 PTZ 诱导小鼠模型中观察到的脆弱拟杆菌抗癫痫效应的转化潜力，我们在 2021 年 2 月至 2022 年 1 月期间纳入了来自深圳儿童医院门诊部的 60 名难治性癫痫患者。所有参与者均为深圳本地居民，饮食习惯相似，自愿同意参加并符合入选标准（表 S5）。参与者被随机分配接受安慰剂或 BF839 治疗 3 个月，同时维持其常规饮食和抗惊厥药物（图 7A 和 7B）。安慰剂组和治疗组的基线特征，包括人口统计学、癫痫发作类型和抗癫痫药物使用情况，均良好平衡（表 S5 和 S6）。具体而言，性别分布在 BF839 组（68.97%男性，31.03%女性）和安慰剂组（50%男性，50%女性）中相似，未观察到显著差异（ $p = 0.359$ ）。治疗后的临床特征见表 S7。在 BF839 组中观察到显著更高的疗效，32%的患者显示癫痫发作有效减少，而安慰剂组为 5%（ $p = 0.0224$ ）（图 7C）。值得注意的是，BF839 的疗效在不同年龄组（0-7 岁和 8-14 岁）中保持一致（ $p = 0.0973$, 0.1618 ）（图 7C）。为量化治疗效果，我们计算了标准化的癫痫发作频率比（治疗后/治疗前）。与安慰剂组相比，BF839 治疗患者的该比值显著更低（ 0.70 ± 0.09 vs. 1.10 ± 0.16 , $p = 0.0117$ ）（图 7D），表明治疗后发作频率降低。

在整个试验期间监测了不良事件，治疗组中约 13.3%的受试者观察到轻微事件，包括腹痛（1/30）、腹泻（1/30）、便秘（1/30）和语言倒退（1/30）。这些副作用是暂时性的，在 1 周内缓解，安慰剂组未报告显著不良事件（表 S8）。对粪便样本的 16S rRNA 测序分析显示，治疗后组间肠道微生物群多样性无显著差异（图 S12A）。然而，BF839 治疗后观察到属水平（图 7E）和门水平（图 7F）的组成变化，与安慰剂组相比，拟杆菌属（BF839: 0.31 ± 0.039 vs. 安慰剂: 0.19 ± 0.033 ; $p = 0.0262$ ）和乳杆菌属（BF839: 0.048 ± 0.011 vs. 安慰剂: 0.007 ± 0.003 ; $p = 0.0015$ ）的相对丰度增加（图 7G 和 7H）。进一步分析显示，治疗后拟杆菌属和乳杆菌属的相对丰度发生显著变化，拟杆菌属水平从 0.19 ± 0.025 升至 0.31 ± 0.0397 （ $p = 0.013$ ），乳杆菌属从 0.015 ± 0.009

升至 0.04 ± 0.01 ($p = 0.0194$) (图 7I 和 7J)。值得注意的是, 与疗效差的患者相比, 疗效良好的患者乳酸杆菌水平显著更高(无效组: 0.026 ± 0.008 vs. 有效组: 0.096 ± 0.02 ; $p < 0.001$) (图 7K)。分层分析显示, 与非 Dravet 综合征患者相比, 该治疗在非 Dravet 综合征患者中更有效(36.84% vs. Dravet 综合征患者: 20%) ($p = 0.2733$) (图 S12B)。PCoA 表明两组间 β 多样性无显著差异(图 S12C)。在非 Dravet 综合征患者中, BF839 治疗有效增加了拟杆菌属(从 0.21 ± 0.03 至 0.38 ± 0.04 ; $p = 0.0014$) 和乳杆菌属(从 0.018 ± 0.012 至 0.054 ± 0.011 ; $p = 0.0346$) 的相对丰度, 而在 Dravet 综合征组中未观察到显著变化(拟杆菌属从 0.13 ± 0.041 至 0.1 ± 0.05 ; $p = 0.728$) (乳杆菌属从 0.003 ± 0.002 至 0.031 ± 0.028 ; $p = 0.3412$) (图 S12D 和 S12E)。两组的 α 多样性均保持不变(图 S12F)。

为评估肠道微生物群组成对治疗反应的预测价值, 我们基于拟杆菌属和乳杆菌属的相对丰度生成了受试者工作特征曲线(图 7L)。这些模型在区分难治性癫痫儿科患者的良好预后方面表现出强大的鉴别能力, 产生的曲线下面积值分别为 0.8235 和 0.8382, 表明其预测性能强劲。BF839 治疗显著调节了肠道微生物群组成, 尤其增加了这些有益菌群的相对丰度(图 7F - 7H)。对 BF839 的临床反应表现出个体间差异, 且与宿主的癫痫相关遗传背景相关。重要的是, BF839 的抗癫痫疗效与拟杆菌属和乳杆菌属在肠道的成功定植呈正相关(图 7K), 并且这种关系在不同遗传背景的个体中均得以保持, 这强调了微生物群在介导益生菌干预个体化治疗反应中的作用。为进一步研究 BF839 与乳杆菌在介导治疗效果中潜在的机制相互作用, 我们使用 MICOM 进行了微生物群落代谢建模分析。该分析揭示, 在治疗应答者中, 琥珀酸盐——而非乙酸盐或烟酸盐——特异性富集, 这一现象在小鼠模型和人类患者中均被一致观察到(图 S12G 和 S12H)。先前的研究表明, 琥珀酸盐作为琥珀酸受体 1 的天然配体, 可激活肠上皮 ChAT 阳性细胞上的该受体, 并可能由此诱导沿肠-脑轴的乙酰胆碱释放[54]。综上所述, 这些发现支持以下解释: BF839 的治疗效果可能至少部分依赖于一个涉及乳酸杆菌的协作性微生物机制, 该机制能增强胆碱能信号传导以减轻癫痫发作。总之, 我们临床试验的发现与临床前研究结果一致, 强化了 BF839 在控制儿童难治性癫痫方面的治疗潜力。

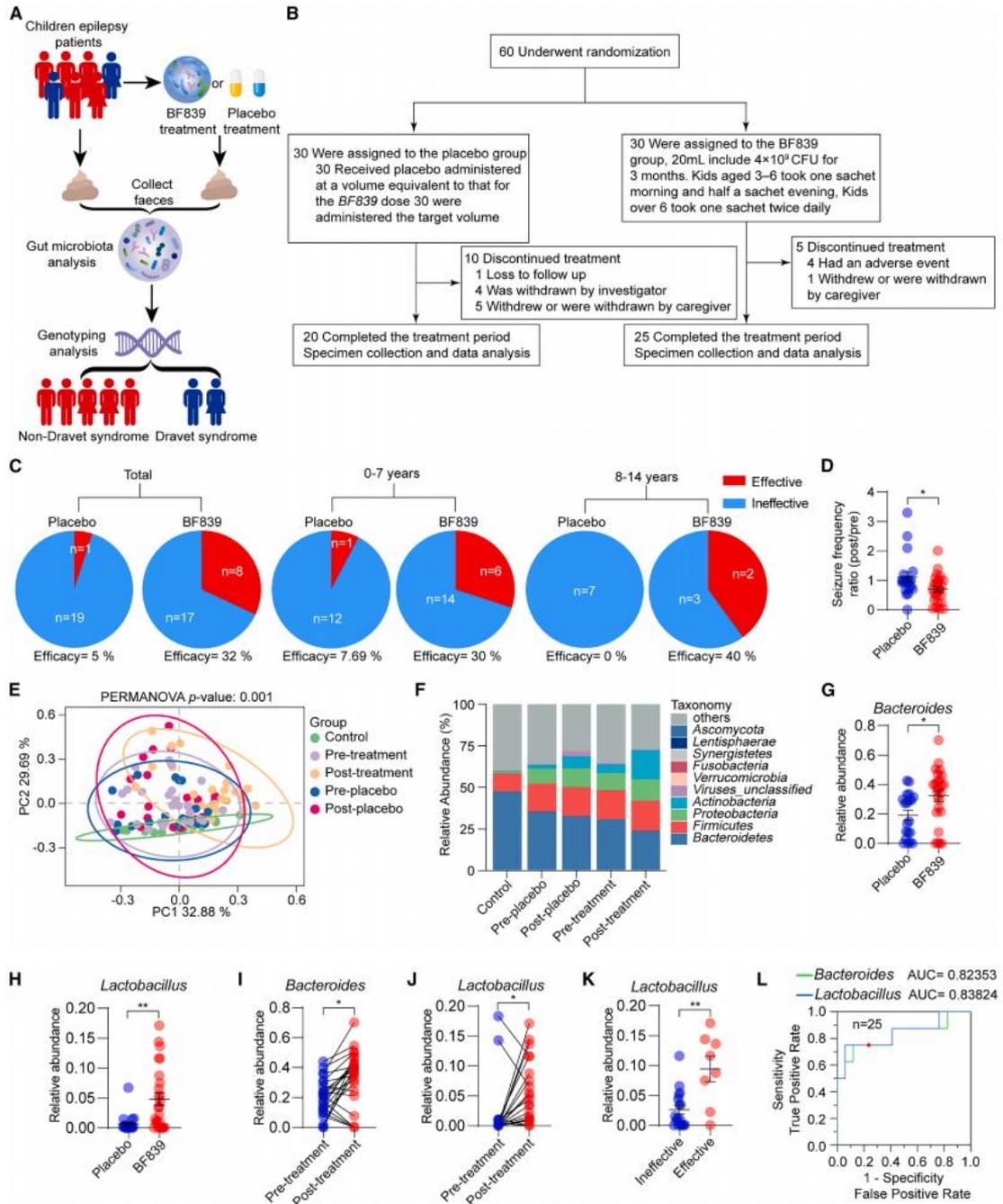


图 7. 口服 BF839 治疗儿童癫痫的试验参与者及治疗结果

- (A) 展示本研究临床试验设计的流程图。
- (B) 临床试验的入组详情及结果。
- (C) BF839 的总体治疗效果，包括按年龄划分的亚组分析。
- (D) 采用标准化的癫痫发作频率比（治疗后/治疗前）来量化治疗反应（非配对 t 检验）。
- (E) 基于加权 UniFrac 矩阵，展示各组在属水平上肠道微生物群组成的主坐标分析图（对照组， $n = 30$ ；安慰剂组， $n = 20$ ；BF839 组， $n = 25$ ）。
- (F) 对照组（ $n = 30$ ）、安慰剂组（ $n = 20$ ）和 BF839 组（ $n = 25$ ）在益生菌治疗前后肠

道细菌门水平的相对丰度。

(G) 拟杆菌属的相对丰度（安慰剂组，n = 20；BF839 组，n = 25）（曼-惠特尼检验）。

(H) 乳杆菌属的相对丰度（安慰剂组，n = 20；BF839 组，n = 25）（非配对 t 检验）。

(I) BF839 治疗前后拟杆菌属的相对丰度（n = 25/组）（非配对 t 检验）。

(J) BF839 治疗前后乳杆菌属的相对丰度（n = 25/组）（非配对 t 检验）。

(K) 对 BF839 治疗无效与有效应答者之间乳杆菌属丰度的比较（无效组，n = 17；有效组，n = 8）（非配对 t 检验）。

(L) 评估 BF839 治疗效果与患者性别和年龄关系的受试者工作特征曲线分析。数据以均值 ± 标准误表示。

另见图 S12 及表 S5、S6、S7、S8。

讨论

本研究鉴定出一条先前未被认识的肠道-大脑胆碱能信号轴，它是脆弱拟杆菌抗癫痫作用的核心介质，从而拓展了当前关于癫痫中肠道微生物群-大脑通讯的概念。虽然先前大多数研究强调循环微生物代谢物在调节神经元兴奋性中的作用，但我们的研究表明，由结肠 ChAT 阳性簇状细胞释放并通过迷走神经传递至大脑的乙酰胆碱，是微生物影响癫痫发作的直接神经通路。这代表了理解肠道微生物如何调节大脑活动的范式转变，超越了代谢信号传导，揭示了一个结构和功能明确的神经环路。

胆碱作为一种必需营养素和神经递质，在神经保护和神经发育中起着关键作用[22, 67, 68]。虽然先前的化学遗传学研究主要关注中枢胆碱能环路在癫痫管理中的作用[20]，但我们的研究鉴定出一条先前未被认识的外周通路：BF839 上调结肠细胞中的 ChAT 表达，增强向 NG 神经元的 ACh 信号传导，并最终抑制海马过度兴奋性。与最近的报告一致，结肠 ChAT 阳性上皮细胞主要为簇状细胞，它们能通过瞬时受体电位阳离子通道亚家族 M 成员 5 依赖性化学感应通路感知微生物来源的信号，并通过白细胞介素 25-第 2 组先天淋巴样细胞-白细胞介素 13 轴，参与放大其扩增和胆碱能输出的免疫反馈[47, 54, 69 - 72]。BF839 可能沿着这条整合的化学感应-免疫环路发挥作用，尽管其精确的上游介质仍有待确定。ChAT

阳性细胞与 synapsin-1 在结肠细胞中的共定位，以及 ChAT 阳性结肠细胞与 NG 之间的逆行神经示踪，提示了其神经特征和将神经信号从肠道传递到大脑的能力。化学遗传学操控表明，结肠 ChAT 阳性细胞-NG 环路的完整性对于 BF839 的治疗效果是不可或缺的：靶向消融结肠 ChAT 阳性细胞、迷走神经切断术或烟碱受体阻断均废除了其抗癫痫效应，而这些神经元的化学遗传学激活则增强了 BF839 介导的癫痫抑制。总之，这些数据表明，这条上行胆碱能通路本身并不充分，但它是必需的，并以一种允许性、调节性的方式放大 BF839 介导的癫痫抑制。这些发现为一条微生物群依赖性的、调节癫痫发生的胆碱能通路提供了环路水平的证据。重要的是，BF839 选择性地提高了肠道和大脑中的胆碱水平，而非全身循环中的水平，强调了该信号通路的局部性和神经限制性。先前的研究主要探索了肠道微生物群及其代谢物如何通过血流影响中枢神经系统[73, 74]。然而，神经通路，特别是迷走神经，在将信号从肠道微生物群传递到大脑（包括胃肠道信息的感知）方面也起着关键作用[75, 76]。新出现的证据强调了迷走胆碱能信号在调节各种生理功能中的关键作用[44, 55, 77]。虽然胆碱能信号传导和 ChAT 阳性细胞在近端小肠中也很丰富[78, 79]，但无论是微生物生态位[49, 50]还是我们的实验数据（图 4M、6M、6N；视频 S1）都表明，BF839 主要通过调动结肠 ChAT 阳性细胞来介导肠-脑通讯和癫痫保护。未来的研究将有助于确定，在特定的微生物或病理生理条件下，近端肠道胆碱能通路是否也可能参与介导基于微生物群的癫痫易感性调节。本研究提出了一种癫痫中新型的益生菌作用机制，即肠道 ChAT 信号主要通过迷走神经而非血流传递到大脑[80 - 82]。

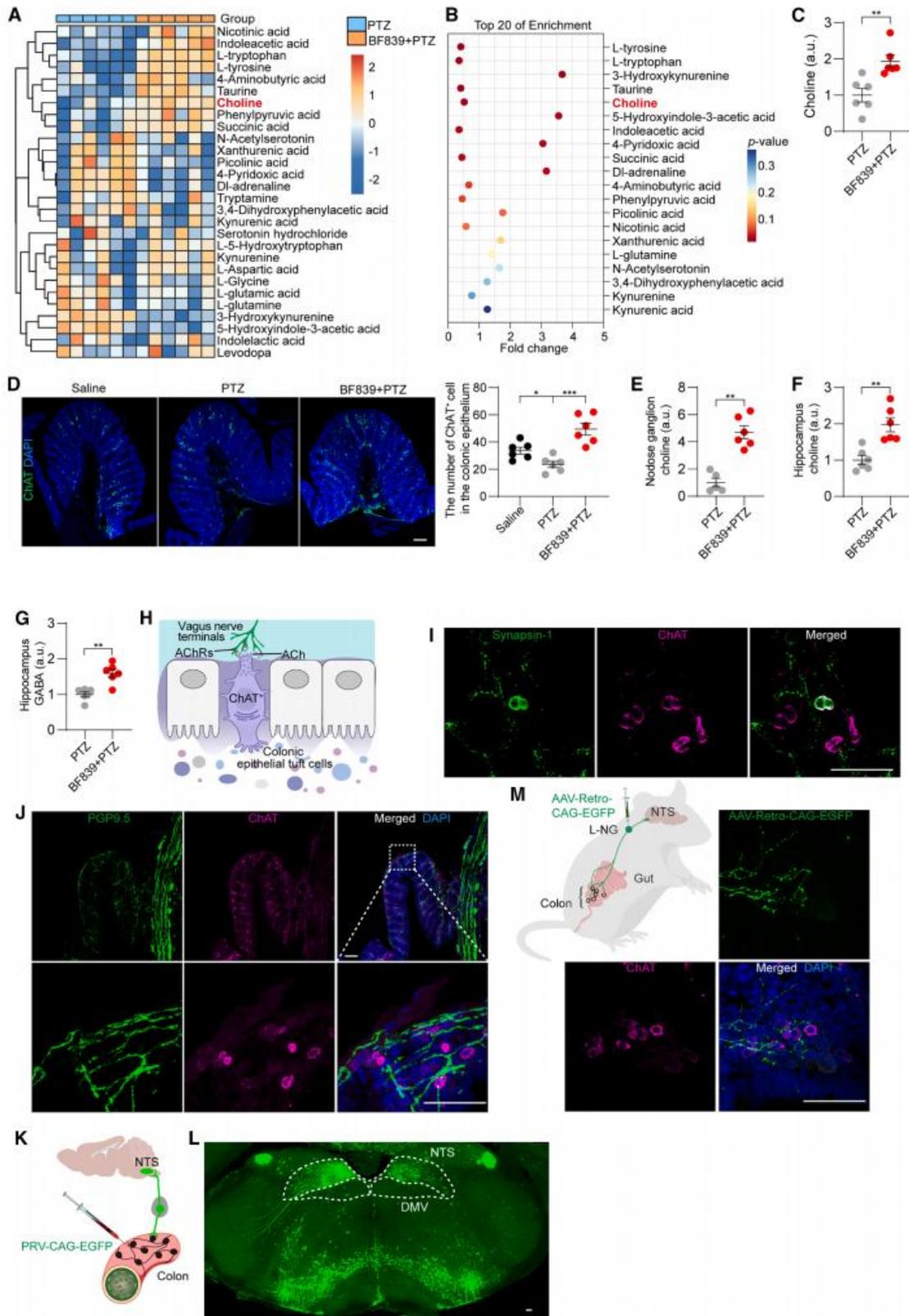


图 4. BF839 提高结肠、结肠神经节和海马中的 ChAT 水平

(A) PTZ 组与 BF839 + PTZ 组小鼠肠道中神经递质相关代谢物的表达水平。热图颜色标尺表示相对于 PTZ 组基线的 \log_2 倍数变化，蓝色表示下调，橙色表示上调，灰色表示变化微小。

小。

(B) 通过靶向代谢组学的随机森林分析鉴定出的神经递质谱，显示经 BF839 处理与未处理的 PTZ 小鼠结肠中差异表达的神经递质（曼-惠特尼检验）。

(C) PTZ 组与 BF839 + PTZ 组小鼠结肠中的胆碱水平（n = 6/组）（曼-惠特尼检验）。

(D) 结肠中 ChAT 的代表性免疫荧光图像，以及 ChAT 阳性（绿色）细胞的定量分析（n = 6/组）（普通单因素方差分析）。

(E) 使用 HPLC 评估的颈段结状神经节中胆碱水平（曼-惠特尼检验）。

(F 和 G) 使用 HPLC 评估的海马中胆碱 (F) 和 GABA (G) 水平（n = 6/组）（曼-惠特尼检验）。

(H) 图解说胆碱能簇状细胞中的突触传递过程。

(I) ChAT 阳性（紫色）细胞与突触前标志物 synapsin-1（绿色）共定位的代表性免疫荧光图像（63 倍放大）（n = 3 只小鼠，每只小鼠 10 个细胞）。

(J) 小鼠结肠中 ChAT 阳性细胞与 PGP9.5（一种神经/神经鞘标记物）的免疫染色及定位（n = 6/组）。

(K 和 L) 将 PRV-CAG-EGFP 注射入结肠，随后在孤束核中检测到信号。

(M) 向左结状神经节注射 AAV9-Retro-CAG-EGFP，并与结肠中的 ChAT 进行共染色。比例尺代表 50 μm 。使用 DAPI 进行核染色。数据以均值 \pm 标准误表示。DMV，迷走神经背核。

另见图 S5 和 S6。

我们的发现指出了 BF839 通过肠-脑通讯发挥抗癫痫作用的多时间尺度机制。其急性效应由肠道灌注 BF839 后数分钟内迷走神经活动的快速增加所证明，这表明微生物代谢物可以快速激活迷走神经传入，这与最近的发现一致[49]。相比之下，其慢性抗癫痫效应与肠道定植的建立和肠道微生物群的重塑同步发生。这些长期效应很可能由持续的迷走神经输入至孤束核等中枢核团所驱动，导致下游与癫痫调节相关的边缘结构的调节。我们目前的结果表明，BF839 可能通过一个两阶段模型发挥作用：通过微生物代谢物实现的快速迷走神经激活，以及由持续的胆碱能信号传导所维持的长期神经可塑性适应。认识并剖析这些不同的时间尺度对于优化基于益生菌的癫痫及其他神经发育障碍疗法至关重要。

我们的研究揭示，迷走神经不仅参与脆弱拟杆菌的急性抗癫痫效应，也参与其持续的抗癫痫效应，这凸显了肠-脑信号传导的慢性神经调节作用。这通过揭示肠-脑胆碱能信号在急性和慢性时间尺度上调节大脑兴奋性的作用，拓展了当前对其的理解，并具有临床转化意义。此外，这些发现表明，虽然急性迷走神经刺激单独的抗癫痫发作效果有限，但联合迷走神经刺激与 BF839 治疗能产生增强的抗癫痫疗效，这突显了一种个性化、基于益生菌的疗法的潜力，该疗法可根据个体迷走神经活性和特定细菌菌株肠道定植能力的差异进行定制，这可能对管理难治性癫痫的发作特别有益。

有研究已确定婴儿后期以拟杆菌属为主的肠道微生物组与随后的神经发育之间存在正相关[83]。然而，我们对于基于微生物群干预的个体差异性及其与人类临床病症相关的潜在分子机制的理解仍存在重大空白。基于先前证据——胃肠道功能障碍和肠道菌群失调导致癫痫易感性增加[29, 84]，以及生酮饮食富集的特定细菌介导抗癫痫获益[14]，我们的研究揭示了 BF839 作用的一个生态学维度：其抗癫痫疗效与乳酸杆菌的肠道定植密切相关。通过促进罗伊氏乳杆菌的生长，BF839 似乎在稳定微生物群落动态的同时，增强了胆碱能肠-脑信号传导。这种协作性相互作用提示，BF839 可能作为一种关键菌株，协调宿主-微生物和微生物-微生物网络以发挥神经保护作用[9, 85]。在多个小鼠模型和儿科患者中均一致观察到乳酸杆菌丰度与癫痫发作抑制之间的关联，这支持了一种精准微生物群治疗框架，即基线微生物生态塑造了益生菌反应性。此外，我们的发现表明，BF839 的治疗获益可能至少部分依赖于与乳酸杆菌的协作性相互作用，其中微生物琥珀酸盐的产生——先前报道可激活肠道 ChAT 阳性细胞上的 SUCNR1——增强了沿肠-脑轴的胆碱能信号传导，从而有助于癫痫发作的抑制[54]。

在临床上，我们的儿科试验不仅验证了 BF839 的转化疗效，也强调了整合宿主遗传学、微生物生态和癫痫亚型的个性化益生菌策略的必要性。与我们的临床前发现一致，试验参与者可分为应答者和无应答者，且治疗疗效与肠道乳酸杆菌丰度呈正相关。需要进一步研究以优化拟杆菌属-乳酸杆菌的组成比例，并阐明其在跨小鼠和人类模型的癫痫保护中的保守机制作用。宿主遗传背景进一步塑造了容纳特定微生物群落并与其相互作用的能力，正如乳糖酶基因与双歧杆菌属之

间的关联所证明的那样[86]。在 Dravet 综合征中观察到的反应减弱，强调了针对不同疾病背景定制基于微生物群干预措施的极端重要性。

综上所述，本研究提供了一个将微生物生态学、肠-脑胆碱能环路和癫痫临床疗效联系起来的综合框架。通过揭示微生物作用的神经机制，我们将微生物群-大脑研究的范围拓展至代谢通讯之外，并提出了将脆弱拟杆菌作为靶向环路的精准微生物群疗法的原型。更广泛地说，这些结果突显了迷走神经感觉通路介导了急性微生物信号传导和持续的大脑兴奋性神经调节控制，在生命早期具有特殊的治疗相关性——这是儿童癫痫干预的关键窗口期，此时肠道微生物群和迷走神经环路具有高度可塑性。尽管微生物群-迷走神经-大脑轴代表了一条在整个生命周期都具有相关性的进化保守通路，但我们的研究解决了儿童难治性癫痫领域一个关键的未满足需求，推进了机制理解，并为儿童癫痫中基于微生物群的精准干预开辟了新途径。

研究的局限性

本研究为 BF839 的抗癫痫作用提供了机制和转化层面的见解，揭示了胆碱能信号在肠道-迷走神经-大脑轴内的关键作用及其对海马兴奋性的影响。然而，仍需承认若干局限性。首先，在癫痫发生过程中，肠道微生物群与中枢神经网络之间复杂、双向的相互作用仍未完全阐明。即使是特征明确的生物标志物，如树突棘密度，也表现出阶段和细胞类型特异性差异，这限制了其作为益生菌介导的抗癫痫效应一致性指标的可靠性。

其次，为期 3 个月的临床试验时长限制了对长期结局的评估，包括癫痫发作频率、认知发展轨迹和生活质量。此外，我们的队列主要由已接受常规抗癫痫药物治疗的耐药性癫痫儿童构成，因此 BF839 在新诊断患者或初治儿童中的疗效尚未得到验证。

第三，环境和生活方式因素——包括饮食、微量营养素摄入及其他暴露——可能影响肠道微生物群组成，尽管基线特征已得到严格控制，但仍不能排除残留混杂因素。样本量（每组 $n = 30$ ）是基于先前的估计值确定，以确保主要终点

有足够的统计效力,但可能仍不足以检测到受临床异质性影响的更细微的治疗效应。

最后,尽管我们的临床前数据显示了对胆碱能肠-脑信号传导和癫痫抑制的强力调节作用,但将其推广到更广泛的儿科人群仍需谨慎。需要进行多中心试验,采用统一的方案、更长的随访期以及全面的元数据收集——包括饮食、遗传和微生物组谱——以验证 BF839 介导的抗癫痫效应的普适性和持久性。

资源可及性

主要联系人

有关进一步信息、资源及试剂的请求应发送给主要联系人刘欣安(邮箱: xa.liu@siat.ac.cn),并由其处理。

材料可及性

本研究未产生新的独特试剂。

数据与代码可及性

- 支持本研究结果的所有数据均可根据合理请求从主要联系人处获取。贾艺聪和刘欣安对本研究产生的所有动物和人类数据拥有完全且不受限制的访问权限。
- 本文未报告原始代码。
- 重新分析本文所报告数据所需的任何额外信息,均可根据请求从主要联系人处获取。

致谢

本工作得到了以下项目的经费支持: 深圳市科技计划项目(KCXFZ20211020163549011 和 JCYJ20250604183013017 资助刘欣安,

JCYJ20210324135211030 资助操德智, JCYJ20250604182920028 资助陈祖昕), 国家自然科学基金(32371213 资助刘欣安, 32000710 和 U20A2016 资助陈祖昕), 深圳市医学研究基金(D2301002 资助刘欣安), 广东省基础与应用基础研究基金(2023A1515011743 资助刘欣安, 2022A1515110624 资助贾艺聪, 2019A1515110190 资助陈祖昕), 湖北省科技计划项目(JCZRQN202500935 资助贾艺聪), 科技创新 2030-重大项目(2022ZD0207100 资助陈祖昕), 深圳市重点基础研究项目(JCYJ20200109115641762 资助陈祖昕), 深圳市科技创新委员会项目(ZDSYS20190902093601675 资助陈祖昕), 深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM202311028 资助操德智), 中国抗癫痫协会癫痫研究基金(CU-C-2021-02 资助操德智), 以及深圳市临床医学研究中心(20220819113341005 资助操德智)。

作者贡献

刘欣安、陈祖昕和操德智设计了本研究。陈鸿、操德智、米佳宇、段晶、廖建湘、贾艺聪和刘欣安负责招募和督导参与者, 并执行所有临床流程。贾艺聪、陈一鸣、邹骞辉、陆丽明和陈鸿负责临床数据的收集与分析。贾艺聪、邹骞辉、陈诗静、陈鸿、李佳昊、洪丰、贾淑慧、景晓源、任嘉彦和穆罕默德·法希姆完成了动物实验。贾艺聪、陈鸿和李佳昊完成了脑电图记录与数据分析。贾艺聪、李佳昊、贾淑慧和景晓源负责粪便样本的制备、处理和测序。贾艺聪、邹骞辉、陈鸿、米佳宇、段晶和李佳昊进行了 16S rRNA 测序数据及粪便宏基因组谱的分析。贾艺聪分析了超高效液相色谱-串联质谱数据。贾艺聪、李佳昊和刘欣安负责统计分析并生成了图表。陈鸿、贾艺聪和陈一鸣进行了临床数据分析, 由陈一鸣、陆丽明、廖建湘、操德智和刘欣安监督。贾艺聪和邹骞辉分析了动物实验数据, 由刘青、徐富强、陈祖昕和刘欣安监督统计分析。贾艺聪、陈祖昕和刘欣安撰写了论文手稿。王立平、韩明虎和保罗·J·肯尼参与了手稿的修订。所有作者均审阅并批准了手稿。

补充信息

补充信息可在以下网址在线获取：
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2025.11.029>。

收稿日期: 2025 年 1 月 30 日

修回日期: 2025 年 10 月 7 日

接受日期: 2025 年 11 月 26 日

参考文献

1. Sondhi, V., Agarwala, A., Pandey, R.M., Chakrabarty, B., Jauhari, P., Lodha, R., Toteja, G.S., Sharma, S., Paul, V.K., Kossoff, E., and Gulati, S. (2020). Efficacy of ketogenic diet, modified Atkins diet, and low glycemic index therapy diet among children with drug-resistant epilepsy: a randomized clinical trial. *JAMA Pediatr.* 174, 944–951. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2020.2282>.
2. Kanner, A.M., and Bicchi, M.M. (2022). Review of antiseizure medications for adults with epilepsy-reply. *JAMA* 328, 681. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.10600>.
3. Mao, X., Wang, X., Jin, M., Li, Q., Jia, J., Li, M., Zhou, H., Liu, Z., Jin, W., Zhao, Y., and Luo, Z. (2022). Critical involvement of lysyl oxidase in seizure-induced neuronal damage through ERK-Alox5-dependent ferroptosis and its therapeutic implications. *Acta Pharm. Sin. B* 12, 3513–3528. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.04.017>.
4. Symonds, J.D., Elliott, K.S., Shetty, J., Armstrong, M., Brunklaus, A., Cutcutache, I., Diver, L.A., Dorris, L., Gardiner, S., Jollands, A., et al. (2021). Early childhood epilepsies: epidemiology, classification, aetiology, and socio-economic determinants. *Brain* 144, 2879–2891. <https://doi.org/10.1093/brain/awab162>.
5. Pan, I., LoPresti, M.A., Clarke, D.F., and Lam, S. (2020). The effectiveness of medical and surgical treatment for children with refractory epilepsy. *Neurosurgery* 88, E73–E82. <https://doi.org/10.1093/neuros/nyaa307>.
6. Jia, Y., Jin, S., Hu, K., Geng, L., Han, C., Kang, R., Pang, Y., Ling, E., Tan, E.K., Pan, Y., and Liu, W. (2021). Gut microbiome modulates *Drosophila* aggression through octopamine signaling. *Nat. Commun.* 12, 2698. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23041-y>.
7. Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., and Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148, 1258–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>.
8. Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 227–238. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>.
9. Wu, G., Xu, T., Zhao, N., Lam, Y.Y., Ding, X., Wei, D., Fan, J., Shi, Y., Li, X., Li, M., et al. (2024). A core microbiome signature as an indicator of health. *Cell* 187, 6550–6565.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.09.019>.

10. Sharon, G., Cruz, N.J., Kang, D.W., Gandal, M.J., Wang, B., Kim, Y.M., Zink, E.M., Casey, C.P., Taylor, B.C., Lane, C.J., et al. (2019). Human gut microbiota from autism spectrum disorder promote behavioral symptoms in mice. *Cell* 177, 1600–1618.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.004>.
11. Lum, G.R., Ha, S.M., Olson, C.A., Blencowe, M., Paramo, J., Reyes, B., Matsumoto, J.H., Yang, X., and Hsiao, E.Y. (2023). Ketogenic diet therapy for pediatric epilepsy is associated with alterations in the human gut microbiome that confer seizure resistance in mice. *Cell Rep.* 42, 113521. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113521>.
12. Cryan, J.F., O’Riordan, K.J., Sandhu, K., Peterson, V., and Dinan, T.G. (2020). The gut microbiome in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 19, 179–194. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30356-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30356-4).
13. Mengoni, F., Salari, V., Kosenkova, I., Tsenov, G., Donadelli, M., Malerba, G., Bertini, G., Del Gallo, F., and Fabene, P.F. (2021). Gut microbiota modulates seizure susceptibility. *Epilepsia* 62, e153–e157. <https://doi.org/10.1111/epi.17009>.
14. Olson, C.A., Vuong, H.E., Yano, J.M., Liang, Q.Y., Nusbaum, D.J., and Hsiao, E.Y. (2018). The gut microbiota mediates the anti-seizure effects of the ketogenic diet. *Cell* 173, 1728–1741.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.027>.
15. Castells-Nobau, A., Mayneris-Perxachs, J., and Fernández-Real, J.M. (2024). Unlocking the mind-gut connection: impact of human microbiome on cognition. *Cell Host Microbe* 32, 1248–1263. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.07.019>.
16. Berryman, M.A., Millettich, P.L., Petrone, J.R., Roesch, L.F., Ilonen, J., Triplett, E.W., and Ludvigsson, J. (2022). Autoimmune-associated genetics impact probiotic colonization of the infant gut. *J. Autoimmun.* 133, 102943. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2022.102943>.
17. Yang, J., Peng, M., Tan, S., Ge, S., Xie, L., Zhou, T., Liu, W., Zhang, K., Zhang, Z., Liu, J., and Shi, J. (2023). Calcium tungstate microgel enhances the delivery and colonization of probiotics during colitis via intestinal ecological niche occupancy. *ACS Cent. Sci.* 9, 1327–1341. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00227>.
18. Jensen, B.A.H., Heyndrickx, M., Jonkers, D., Mackie, A., Millet, S., Naghibi, M., Pærregaard, S.I., Pot, B., Saulnier, D., Sina, C., et al. (2023). Small intestine vs. colon ecology and physiology: Why it matters in probiotic administration. *Cell Rep. Med.* 4, 101190. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101190>.
19. Picciotto, M.R., Higley, M.J., and Mineur, Y.S. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76, 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>.

20. Nguyen, Q.A., Klein, P.M., Xie, C., Benthall, K.N., lafrati, J., Homidan, J., Bendor, J.T., Dudok, B., Farrell, J.S., Gschwind, T., et al. (2024). Acetylcholine receptor based chemogenetics engineered for neuronal inhibition and seizure control assessed in mice. *Nat. Commun.* 15, 601. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44853-8>.
21. Becchetti, A., Grandi, L.C., Cerina, M., and Amadeo, A. (2023). Nicotinic acetylcholine receptors and epilepsy. *Pharmacol. Res.* 189, 106698. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106698>.
22. Wang, Y., Wang, Y., Xu, C., Wang, S., Tan, N., Chen, C., Chen, L., Wu, X., Fei, F., Cheng, H., et al. (2020). Direct septum-hippocampus cholinergic circuit attenuates seizure through driving somatostatin inhibition. *Biol. Psychiatry* 87, 843–856. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.11.014>.
23. Kang, W.K., Florman, J.T., Araya, A., Fox, B.W., Thackeray, A., Schroeder, F.C., Walhout, A.J.M., and Alkema, M.J. (2024). Vitamin B12 produced by gut bacteria modulates cholinergic signalling. *Nat. Cell Biol.* 26, 72–85. <https://doi.org/10.1038/s41556-023-01299-2>.
24. Petsakou, A., Liu, Y., Liu, Y., Comjean, A., Hu, Y., and Perrimon, N. (2023). Cholinergic neurons trigger epithelial Ca²⁺ currents to heal the gut. *Nature* 623, 122–131. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06627-y>.
25. Suez, J., Zmora, N., Segal, E., and Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nat. Med.* 25, 716–729. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x>.
26. Whelan, K., Alexander, M., Gaiani, C., Lunken, G., Holmes, A., Staudacher, H.M., Theis, S., and Marco, M.L. (2024). Design and reporting of prebiotic and probiotic clinical trials in the context of diet and the gut microbiome. *Nat. Microbiol.* 9, 2785–2794. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01831-6>.
27. Bialer, M., and White, H.S. (2010). Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 68–82. <https://doi.org/10.1038/nrd2997>.
28. Yang, Y., Tian, X., Xu, D., Zheng, F., Lu, X., Zhang, Y., Ma, Y., Li, Y., Xu, X., Zhu, B., and Wang, X. (2018). GPR40 modulates epileptic seizure and NMDA receptor function. *Sci. Adv.* 4, eaau2357. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau2357>.
29. Dahlin, M., and Prast-Nielsen, S. (2019). The gut microbiome and epilepsy. *eBioMedicine* 44, 741–746. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.024>.
30. Geng, Z., Wang, X., Wu, F., Cao, Z., and Liu, J. (2023). Biointerface mineralization generates ultrasensitive gut microbes as oral biotherapeutics. *Sci. Adv.* 9, eade0997. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade0997>.

31. Casterline, B.W., Hecht, A.L., Choi, V.M., and Bubeck-Wardenburg, J. (2017). The *Bacteroides fragilis* pathogenicity island links virulence and strain competition. *Gut Microbes* 8, 374–383. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290758>.
32. Zhang, W., Zhu, B., Xu, J., Liu, Y., Qiu, E., Li, Z., Li, Z., He, Y., Zhou, H., Bai, Y., and Zhi, F. (2018). *Bacteroides fragilis* protects against antibiotic-associated diarrhea in rats by modulating intestinal defenses. *Front. Immunol.* 9, 1040. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01040>.
33. Wexler, H.M. (2007). *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 593–621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>.
34. Rosenberg, E.C., Chamberland, S., Bazelot, M., Nebet, E.R., Wang, X., McKenzie, S., Jain, S., Greenhill, S., Wilson, M., Marley, N., et al. (2023). Cannabidiol modulates excitatory-inhibitory ratio to counter hippocampal hyperactivity. *Neuron* 111, 1282–1300.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.01.018>.
35. Choy, M., Dadgar-Kiani, E., Cron, G.O., Duffy, B.A., Schmid, F., Edelman, B.J., Asaad, M., Chan, R.W., Vahdat, S., and Lee, J.H. (2022). Repeated hippocampal seizures lead to brain-wide reorganization of circuits and seizure propagation pathways. *Neuron* 110, 221–236.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.10.010>.
36. Taylor, J.A., Rodgers, K.M., Bercum, F.M., Booth, C.J., Dudek, F.E., and Barth, D.S. (2017). Voluntary control of epileptiform spike-wave discharges in awake rats. *J. Neurosci.* 37, 5861–5869. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3235-16.2017>.
37. Kumari, S., and Brewster, A.L. (2024). Exploring dendritic and spine structural profiles in epilepsy: insights from human studies and experimental animal models. *Epilepsy Curr.* 24, 40–46. <https://doi.org/10.1177/15357597231218603>.
38. Snigdha, S., Ha, K., Tsai, P., Dinan, T.G., Bartos, J.D., and Shahid, M. (2022). Probiotics: potential novel therapeutics for microbiota-gut-brain axis dysfunction across gender and lifespan. *Pharmacol. Ther.* 231, 107978. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107978>.
39. Waise, T.M.Z., Dranse, H.J., and Lam, T.K.T. (2018). The metabolic role of vagal afferent innervation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 625–636. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0062-1>.
40. Kaur, S., Selden, N.R., and Aballay, A. (2023). Anti-inflammatory effects of vagus nerve stimulation in pediatric patients with epilepsy. *Front. Immunol.* 14, 1093574. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1093574>.

41. Jain, P., and Arya, R. (2021). Vagus nerve stimulation and seizure outcomes in pediatric refractory epilepsy: systematic review and meta-analysis. *Neurology* 96, 1041–1051. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000012030>.
42. Dawson, J., Abdul-Rahim, A.H., and Kimberley, T.J. (2024). Neurostimulation for treatment of post-stroke impairments. *Nat. Rev. Neurol.* 20, 259–268. <https://doi.org/10.1038/s41582-024-00953-z>.
43. Stumpp, L., Smets, H., Vespa, S., Cury, J., Doguet, P., Delbeke, J., Nonclercq, A., and El Tahry, R. (2021). Vagus nerve electroneurogram-based detection of acute pentylenetetrazol induced seizures in rats. *Int. J. Neural Syst.* 31, 2150024. <https://doi.org/10.1142/S0129065721500246>.
44. Bowles, S., Hickman, J., Peng, X., Williamson, W.R., Huang, R., Washington, K., Donegan, D., and Welle, C.G. (2022). Vagus nerve stimulation drives selective circuit modulation through cholinergic reinforcement. *Neuron* 110, 2867–2885.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.017>.
45. Kloc, M.L., Holmes, G.L., and Barry, J.M. (2024). Sex differences in cholinergic signaling affect functional outcomes for theta-gamma coordination in hippocampal subcircuits following experimental febrile status epilepticus. *Epilepsia* 65, 2138–2151. <https://doi.org/10.1111/epi.18017>.
46. Friedman, A., Behrens, C.J., and Heinemann, U. (2007). Cholinergic dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48, 126–130. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01300.x>.
47. Ndjim, M., Gasmi, I., Herbert, F., Joséphine, C., Bas, J., Lamrani, A., Coutry, N., Henry, S., Zimmermann, V.S., Dardalhon, V., et al. (2024). Tuft cell acetylcholine is released into the gut lumen to promote anti-helminth immunity. *Immunity* 57, 1260–1273.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.04.018>.
48. Randlett, O., Wee, C.L., Naumann, E.A., Nnaemeka, O., Schoppik, D., Fitzgerald, J.E., Portugues, R., Lacoste, A.M.B., Riegler, C., Engert, F., and Schier, A.F. (2015). Whole-brain activity mapping onto a zebrafish brain atlas. *Nat. Methods* 12, 1039–1046. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3581>.
49. Jameson, K.G., Kazmi, S.A., Ohara, T.E., Son, C., Yu, K.B., Mazdeyasnan, D., Leshan, E., Vuong, H.E., Paramo, J., Lopez-Romero, A., et al. (2025). Select microbial metabolites in the small intestinal lumen regulate vagal activity via receptor-mediated signaling. *iScience* 28, 111699. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.111699>.
50. Simon, G.L., and Gorbach, S.L. (1984). Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 86, 174–193. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(84\)90606-1](https://doi.org/10.1016/0016-5085(84)90606-1).

51. Rode, J., Brengesjö Johnson, L., König, J., Rangel, I., Engstrand, L., Repsilber, D., and Brummer, R.J. (2024). Fecal samples and rectal swabs adequately reflect the human colonic luminal microbiota. *Gut Microbes* 16, 2416912. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2416912>.
52. Drokhlyansky, E., Smillie, C.S., Van Wittenberghe, N., Ericsson, M., Griffin, G.K., Eraslan, G., Dionne, D., Cuoco, M.S., Goder-Reiser, M.N., Sharova, T., et al. (2020). The human and mouse enteric nervous system at single-cell resolution. *Cell* 182, 1606–1622.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.003>.
53. Širvinskas, D., Omrani, O., Lu, J., Rasa, M., Krepelova, A., Adam, L., Kaepfel, S., Sommer, F., and Neri, F. (2022). Single-cell atlas of the aging mouse colon. *iScience* 25, 104202. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104202>.
54. Billipp, T.E., Fung, C., Webeck, L.M., Sargent, D.B., Gologorsky, M.B., Chen, Z., McDaniel, M.M., Kasal, D.N., McGinty, J.W., Barrow, K.A., et al. (2024). Tuft cell-derived acetylcholine promotes epithelial chloride secretion and intestinal helminth clearance. *Immunity* 57, 1243–1259.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.03.023>.
55. Kupari, J., Häring, M., Agirre, E., Castelo-Branco, G., and Ernfors, P. (2019). An atlas of vagal sensory neurons and their molecular specialization. *Cell Rep.* 27, 2508–2523.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.096>.
56. Kaelberer, M.M., Rupprecht, L.E., Liu, W.W., Weng, P., and Bohórquez, D.V. (2020). Neuropod cells: the emerging biology of gut-brain sensory transduction. *Annu. Rev. Neurosci.* 43, 337–353. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-091619-022657>.
57. Kaelberer, M.M., Buchanan, K.L., Klein, M.E., Barth, B.B., Montoya, M.M., Shen, X., and Bohórquez, D.V. (2018). A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science* 361, eaat5236. <https://doi.org/10.1126/science.aat5236>.
58. Buchanan, K.L., Rupprecht, L.E., Kaelberer, M.M., Sahasrabudhe, A., Klein, M.E., Villalobos, J.A., Liu, W.W., Yang, A., Gelman, J., Park, S., et al. (2022). The preference for sugar over sweetener depends on a gut sensor cell. *Nat. Neurosci.* 25, 191–200. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00982-7>.
59. Jia, J., Zheng, L., Ye, L., Chen, J., Shu, S., Xu, S., Bao, X., Xia, S., Liu, R., Xu, Y., and Zhang, M. (2023). CD11c⁺ microglia promote white matter repair after ischemic stroke. *Cell Death Dis.* 14, 156. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05689-0>.
60. Ali, M.S.S., Parastoei, G., Raman, S., Mack, J., Kim, Y.S., and Chung, M.K. (2024). Genetic labeling of the nucleus of tractus solitarius neurons associated with electrical stimulation of the cervical or auricular vagus nerve in mice. *Brain Stimul.* 17, 987–1000. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2024.08.007>.
61. Okonogi, T., Kuga, N., Yamakawa, M., Kayama, T., Ikegaya, Y., and Sasaki, T. (2024). Stress-induced vagal activity influences anxiety-relevant prefrontal and amygdala neuronal oscillations in male mice. *Nat. Commun.* 15, 183. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44205-y>.

62. Parker, A., Romano, S., Ansorge, R., Aboelnour, A., Le Gall, G., Savva, G.M., Pontifex, M.G., Telatin, A., Baker, D., Jones, E., et al. (2022). Fecal microbiota transfer between young and aged mice reverses hallmarks of the aging gut, eye, and brain. *Microbiome* 10, 68. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01243-w>.
63. Diener, C., Gibbons, S.M., and Resendis-Antonio, O. (2020). MICOM: metagenome-scale modeling to infer metabolic interactions in the gut microbiota. *mSystems* 5, e00606–e00619. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00606-19>.
64. Ardalani, O., Phaneuf, P.V., Mohite, O.S., Nielsen, L.K., and Palsson, B.O. (2024). Pangenome reconstruction of Lactobacillaceae metabolism predicts species-specific metabolic traits. *mSystems* 9, e0015624. <https://doi.org/10.1128/msystems.00156-24>.
65. Bloom, S.M., Mafunda, N.A., Woolston, B.M., Hayward, M.R., Frempong, J.F., Abai, A.B., Xu, J., Mitchell, A.J., Westergaard, X., Hussain, F.A., et al. (2022). Cysteine dependence of *Lactobacillus iners* is a potential therapeutic target for vaginal microbiota modulation. *Nat. Microbiol.* 7, 434–450. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01070-7>.
66. Landete, J.M., García-Haro, L., Blasco, A., Manzanares, P., Berbegal, C., Monedero, V., and Zúñiga, M. (2010). Requirement of the *Lactobacillus casei* MaeKR two-component system for L-malic acid utilization via a malic enzyme pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 84–95. <https://doi.org/10.1128/aem.02145-09>.
67. Sharon, G., Sampson, T.R., Geschwind, D.H., and Mazmanian, S.K. (2016). The central nervous system and the gut microbiome. *Cell* 167, 915–932. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.027>.
68. Coley, E.J.L., and Hsiao, E.Y. (2021). Malnutrition and the microbiome as modifiers of early neurodevelopment. *Trends Neurosci.* 44, 753–764. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.06.004>.
69. Howitt, M.R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A.M., Tran, S.V., Weinstock, J.V., Gallini, C.A., Redding, K., Margolskee, R.F., Osborne, L.C., et al. (2016). Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* 351, 1329–1333. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1648>.
70. Parikh, K., Antanaviciute, A., Fawkner-Corbett, D., Jagielowicz, M., Aulicino, A., Lagerholm, C., Davis, S., Kinchen, J., Chen, H.H., Alham, N.K., et al. (2019). Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature* 567, 49–55. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0992-y>.

71. Schneider, C., O'Leary, C.E., von Moltke, J., Liang, H.E., Ang, Q.Y., Turnbaugh, P.J., Radhakrishnan, S., Pellizzon, M., Ma, A., and Locksley, R.M. (2018). A Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling. *Cell* 174, 271–284.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.014>.
72. Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., et al. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529, 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature16527>.
73. Cuesta, S., Burdisso, P., Segev, A., Kourrich, S., and Sperandio, V. (2022). Gut colonization by *Proteobacteria* alters host metabolism and modulates cocaine neurobehavioral responses. *Cell Host Microbe* 30, 1615–1629.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.09.014>.
74. Parker, A., Fonseca, S., and Carding, S.R. (2020). Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health. *Gut Microbes* 11, 135–157. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1638722>.
75. Borre, Y.E., O'Keefe, G.W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol. Med.* 20, 509–518. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.05.002>.
76. Schneider, E., O'Riordan, K.J., Clarke, G., and Cryan, J.F. (2024). Feeding gut microbes to nourish the brain: unravelling the diet-microbiota-gut-brain axis. *Nat. Metab.* 6, 1454–1478. <https://doi.org/10.1038/s42255-024-01108-6>.
77. Tao, J., Campbell, J.N., Tsai, L.T., Wu, C., Liberles, S.D., and Lowell, B.B. (2021). Highly selective brain-to-gut communication via genetically defined vagus neurons. *Neuron* 109, 2106–2115.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.05.004>.
78. Schütz, B., Ruppert, A.L., Strobel, O., Lazarus, M., Urade, Y., Büchler, M.W., and Weihe, E. (2019). Distribution pattern and molecular signature of cholinergic tuft cells in human gastro-intestinal and pancreatic-biliary tract. *Sci. Rep.* 9, 17466. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53997-3>.
79. Muise, E.D., Gandotra, N., Tackett, J.J., Bamdad, M.C., and Cowles, R.A. (2017). Distribution of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in the murine small intestine. *Life Sci.* 169, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.10.030>.
80. Goldstein, N., McKnight, A.D., Carty, J.R.E., Arnold, M., Betley, J.N., and Alhadeff, A.L. (2021). Hypothalamic detection of macronutrients via multiple gut-brain pathways. *Cell Metab.* 33, 676–687.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.12.018>.
81. Rupprecht, L.E., and Bohórquez, D.V. (2021). The nerve not taken. *Cell Metab.* 33, 466–467. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.02.014>.

82. Sahasrabudhe, A., Rupprecht, L.E., Orguc, S., Khudiyev, T., Tanaka, T., Sands, J., Zhu, W., Tabet, A., Manthey, M., Allen, H., et al. (2023). Multifunctional microelectronic fibers enable wireless modulation of gut and brain neural circuits. *Nat. Biotechnol.* 42, 892–904. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01833-5>.
83. Tamana, S.K., Tun, H.M., Konya, T., Chari, R.S., Field, C.J., Guttman, D.S., Becker, A.B., Moraes, T.J., Turvey, S.E., Subbarao, P., et al. (2021). *Bacteroides*-dominant gut microbiome of late infancy is associated with enhanced neurodevelopment. *Gut Microbes* 13, 1–17. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1930875>.
84. Citraro, R., Lembo, F., De Caro, C., Tallarico, M., Coretti, L., Iannone, L.F., Leo, A., Palumbo, D., Cuomo, M., Buommino, E., et al. (2021). First evidence of altered microbiota and intestinal damage and their link to absence epilepsy in a genetic animal model, the WAG/Rij rat. *Epilepsia* 62, 529–541. <https://doi.org/10.1111/epi.16813>.
85. Furuichi, M., Kawaguchi, T., Pust, M.M., Yasuma-Mitobe, K., Plichta, D.R., Hasegawa, N., Ohya, T., Bhattarai, S.K., Sasajima, S., Aoto, Y., et al. (2024). Commensal consortia decolonize *Enterobacteriaceae* via ecological control. *Nature* 633, 878–886. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07960-6>.
86. Sanna, S., Kurilshikov, A., van der Graaf, A., Fu, J., and Zhernakova, A. (2022). Challenges and future directions for studying effects of host genetics on the gut microbiome. *Nat. Genet.* 54, 100–106. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00983-z>.
87. Fisher, R.S., Cross, J.H., French, J.A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F.E., Lagae, L., Moshé, S.L., Peltola, J., Roulet Perez, E., et al. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58, 522–530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>.
88. Zhong, H.J., Wang, S.Q., Zhang, R.X., Zhuang, Y.P., Li, L., Yi, S.Z., Li, Y., Wu, L., Ding, Y., Zhang, J., et al. (2023). Supplementation with high-GABA-producing *Lactobacillus plantarum* L5 ameliorates essential tremor triggered by decreased gut bacteria-derived GABA. *Transl. Neurodegener.* 12, 58. <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00391-9>.
89. Zhu, H., Cao, C., Wu, Z., Zhang, H., Sun, Z., Wang, M., Xu, H., Zhao, Z., Wang, Y., Pei, G., et al. (2021). The probiotic *L. casei* Zhang slows the progression of acute and chronic kidney disease. *Cell Metab.* 33, 2091–2093. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.08.015>.
90. Lin, R., Wang, R., Yuan, J., Feng, Q., Zhou, Y., Zeng, S., Ren, M., Jiang, S., Ni, H., Zhou, C., et al. (2018). Cell-type-specific and projection-specific brain-wide reconstruction of single neurons. *Nat. Methods* 15, 1033–1036. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0184-y>.
91. Fowler, C.D., Lu, Q., Johnson, P.M., Marks, M.J., and Kenny, P.J. (2011). Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature* 471, 597–601. <https://doi.org/10.1038/nature09797>.

92. Mughrabi, I.T., Hickman, J., Jayaprakash, N., Thompson, D., Ahmed, U., Papadoyannis, E.S., Chang, Y.C., Abbas, A., Datta-Chaudhuri, T., Chang, E.H., et al. (2021). Development and characterization of a chronic implant mouse model for vagus nerve stimulation. *eLife* 10, e61270. <https://doi.org/10.7554/eLife.61270>.
93. Fallon, I.P., Hughes, R.N., Severino, F.P.U., Kim, N., Lawry, C.M., Watson, G.D.R., Roshchina, M., and Yin, H.H. (2023). The role of the parafascicular thalamic nucleus in action initiation and steering. *Curr. Biol.* 33, 2941–2951.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.06.025>.
94. Kang, W., Ju, C., Joo, J., Lee, J., Shon, Y.M., and Park, S.M. (2022). Closed-loop direct control of seizure focus in a rodent model of temporal lobe epilepsy via localized electric fields applied sequentially. *Nat. Commun.* 13, 7805. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35540-7>.
95. Huang, Y.J., Hung, C.C., Hsu, P.C., Lee, P.Y., Tsai, Y.A., Hsin, Y.C., Lee, X.T., Chou, C.C., Chen, M.L., Tarng, D.C., and Lee, Y.H. (2023). Astrocytic aryl hydrocarbon receptor mediates chronic kidney disease-associated mental disorders involving GLT1 hypofunction and neuronal activity enhancement in the mouse brain. *Glia* 71, 1057–1080. <https://doi.org/10.1002/glia.24326>.
96. Heinken, A., Hertel, J., Acharya, G., Ravcheev, D.A., Nyga, M., Okpala, O.E., Hogan, M., Magnúsdóttir, S., Martinelli, F., Nap, B., et al. (2023). Genome-scale metabolic reconstruction of 7,302 human microorganisms for personalized medicine. *Nat. Biotechnol.* 41, 1320–1331. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01628-0>.
97. El-Sharkawy, O.S., El-Rashidy, O.F., Elagouza, I.A.A., Nassar, B.A., and Taha, S.I. (2024). The beneficial effect of probiotics as an adjuvant treatment in childhood drug resistant epilepsy: a prospective pilot study. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 38, 3946320241291276. <https://doi.org/10.1177/03946320241291276>.
98. Nabbout, R., Mistry, A., Zuberi, S., Villeneuve, N., Gil-Nagel, A., Sanchez-Carpintero, R., Stephani, U., Laux, L., Wirrell, E., Knupp, K., et al. (2020). Fenfluramine for treatment-resistant seizures in patients with Dravet syndrome receiving stiripentol-inclusive regimens: a randomized clinical trial. *JAMA Neurol.* 77, 300–308. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.4113>.

菌株与安慰剂来源

脆弱拟杆菌 839、鼠李糖乳杆菌 TT628 及安慰剂由广州图腾生命医学研究公司提供。

BF839 菌株信息

BF839 是非产毒性脆弱拟杆菌菌株，最初于 1983 年由张箐箐在一项针对正常肠道微生物群的研究中，从健康、营养状况良好的婴儿粪便中分离。基于全面的微生物学表征、功能分析和临床观察，该菌株被鉴定为一种有益的人体共生菌，并于 1991 年由张箐箐命名为 BF839。

本研究中，BF839 由大连图腾生物工程有限公司（曾用名：大连图腾生物工程研究所）作为纯化的细菌分离株（而非商业益生菌混合物）馈赠。该产品在使用前经过了质量控制检测，包括 16S rRNA 测序和活菌计数评估。活益生菌数量不低于 10^8 CFU/g。

细菌培养实验

BF839 在 37°C、厌氧条件下于改良 Gifu 厌氧培养基中培养。罗伊氏乳杆菌在 37°C、厌氧条件下于 pH 值为 6.0 的 MRS 培养基中培养。所有培养物均通过全长 16S rRNA 测序进行鉴定。