

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.03.006

红茶菌在脑缺血再灌注损伤大鼠模型中的作用研究*

梁国晶¹ 任海燕² 张钰鸽³ 张恺纯⁴ 文娟^{1Δ}

(1 新疆医科大学基础医学院病理生理学教研室 新疆 乌鲁木齐 830011; 2 新疆医科大学实验室与设备管理处中心实验室 新疆 乌鲁木齐 830011; 3 长葛市人民医院病理科 河南 长葛 461500; 4 乌鲁木齐市友谊医院心内科 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要 目的:探讨红茶菌在脑缺血再灌注损伤大鼠模型中是否有改善效果。**方法:**将 48 只清洁级 SD 大鼠根据随机数字表法分为假手术组、模型组、红茶菌组、依达拉奉组。红茶菌组术前给予红茶菌液灌胃 7 天以及再灌注麻醉清醒后追加灌胃 1 次,依达拉奉组大鼠在再灌注前 15 min 经腹腔注射依达拉奉,模型组和假手术组给予生理盐水。遵循 Zea Longa 线栓法阻断大鼠大脑中动脉血流 2 h 后恢复再灌注 24 h 建立 MCAO 模型,假手术组大鼠仅分离颈总动脉。再灌注 24 h 后,神经行为学评分评估脑损伤程度;TTC 染色观察红茶菌对大鼠脑梗死面积比的影响并用 Image J 软件测定梗死面积;HE 染色后观察大鼠脑组织皮层神经元病理形态学;透射电镜观察大鼠皮层神经元超微结构及线粒体形态。**结果:**脑缺血再灌注 24 h 后,对大鼠进行神经行为学评分,红茶菌组神经行为学评分为 (2.21 ± 0.60) ,依达拉奉组神经行为学评分为 (2.01 ± 0.66) ,均显著低于模型组 (2.52 ± 0.52) ($P < 0.05$);TTC 染色后观察到模型组大鼠大脑梗死灶明显,红茶菌组与依达拉奉组较模型组大鼠梗死面积明显减小;HE 结果显示模型组大鼠皮层神经元损伤明显,红茶菌组与依达拉奉组较模型组大鼠皮层神经元坏死减轻,梗死面积缩小;透射电镜下观察到模型组大鼠染色质溶解,线粒体肿胀,红茶菌组与依达拉奉组较模型组溶解减少,线粒体结构较完整。**结论:**红茶菌可减轻脑缺血再灌注损伤大鼠模型的神经元损伤,有望成为改善脑缺血再灌注损伤的疗法或辅助疗法。

关键词:脑缺血再灌注损伤;红茶菌;微生物-肠-脑轴;大鼠模型

中图分类号:Q95-3;R743 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)03-428-05

To Study the Role of Kombucha in the Rat Model of Cerebral Ischemia-reperfusion Injury*

LIANG Guo-jing¹, REN Hai-yan², ZHANG Yu-ge³, ZHANG Kai-chun⁴, WEN Juan^{1Δ}

(1 Department of pathophysiology, Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China;

2 Central Laboratory of laboratory and equipment management division, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China;

3 Department of Pathology, Changge Municipal people's Hospital, Changge, Henan, 461500, China;

4 Internal Department of Medicine-Cardiovascular, Urumqi Friendship Hospital, Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether kombucha can improve cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods:** Forty-eight clean grade Sprague Dawley rats were randomly divided into Sham group, Model group, Kombucha group 2 mL / (300 g·d) and Edaravone group 3 mg/ (300 g·d). The rats in the Kombucha group were given kombucha solution for 7 days before operation and once after the anesthesia awakening. The rats in the Edaravone group were intraperitoneally injected with Edaravone before reperfusion, and the Model group and Sham operation group were given 9% sodium chloride solution. According to Zea Longa thread occlusion method, the blood flow of middle cerebral artery was occluded for 2 hours and then reperused for 24 hours. The rats in Sham group were only separated from the common artery. After 24 hours of reperfusion, the degree of brain injury was evaluated by neurobehavioral score, the effect of kombucha on the ratio of cerebral infarct area was observed by TTC staining and the infarct area was measured by ImageJ software, the pathomorphology of cortical neurons was observed after HE staining, and the ultrastructure and mitochondrial morphology of cortical neurons were observed by transmission electron microscope. **Results:** 24 hours after cerebral ischemia and reperfusion, the neurobehavioral scores of rats in Kombucha group and Edaravone group were 2.21 ± 0.60 and 2.01 ± 0.66 , respectively, which were significantly lower than those in Model group (2.52 ± 0.52) ($P < 0.05$). After TTC staining, it was observed that the cerebral infarction focus was obvious in the model group, and the infarct area in the kombucha group and Edaravone group was significantly smaller than that in the Model group, and the HE results showed that the damage of cortical neurons in the model group was obvious, and the cerebral cortical neuronal necrosis and infarct area in the Kombucha group and Edaravone group were less than those in the Model group. Under transmission electron microscope, it was observed that chromatin dissolved and mitochondria swelled in the Model group. Compared with the model

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2019D01C191)

作者简介:梁国晶(1999-),硕士研究生,主要研究方向:神经病理生理学, E-mail: 1461107773@qq.com

Δ 通讯作者:文娟(1968-),博士,副教授,主要研究方向:神经病理生理学, E-mail: juanjwen@sina.com

(收稿日期:2022-07-23 接受日期:2022-08-18)

group, the dissolution decreased in the tea Kombucha group and Edaravone group, and the mitochondrial structure was relatively complete. **Conclusion:** Kombucha can reduce the neuronal injury in the rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury, and it is expected to be a therapy or adjuvant therapy for improving cerebral ischemia-reperfusion injury.

Key words: Cerebral ischemia reperfusion injury; Kombucha; Microbial-gut-brain axis; Rat model

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3; R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)03-428-05

前言

脑缺血是由于大脑动脉阻塞导致血液供应不足,导致大脑中所有细胞的葡萄糖/氧气损耗,神经细胞损伤死亡^[1]。使缺血脑组织尽早恢复或再通血液灌注被认为是临床上的首选治疗方式,而快速再灌注可导致大脑缺血区域进一步损伤,称为脑缺血再灌注损伤(CIRI)^[2]。基于 CIRI 的病理机制,研究者提出了能量代谢障碍、钙超载、兴奋性氨基酸毒性、线粒体损伤、自由基生成、氧化应激等一系列学说。氧化应激损伤在 CIRI 复杂的病理生理学机制中具有重要作用,因此通过清除脑内的羟基基团,降低神经细胞内氧化应激水平可减轻脑缺血损伤^[3,4]。发生脑缺血再灌注损伤后,患者神经功能严重受损,出现意识障碍而影响营养成分的摄入,引起胃肠功能紊乱和肠道菌群失衡等,伴随出现营养不良和免疫力降低,严重影响患者生活质量。近年来,通过肠道菌群改善脑损伤成为研究热点。肠道菌通过“微生物-肠-脑轴”(microbiota-gut-brain axis, MGBA)调节脑卒中的风险因素,在脑缺血病程中发挥积极作用,改变胃肠道功能,改善肠道免疫与功能,从而发挥神经系统保护作用^[5,6]。

红茶菌(Kombucha)又名康普茶,是我国民间的一种传统饮品,由红茶、糖、酵母以及益生菌发酵而成^[7]。红茶菌作用广泛,可改善肝功能、免疫系统、胃肠功能,并具有解毒、抗炎、降胆固醇和降血压等多种作用^[8]。红茶菌的发酵原料主要为茶叶与红茶菌菌种,在发酵过程中会产生大量的有益物质,包括氨基酸、茶多酚、黄酮类化合物、咖啡因、维生素等。其中,酚类物质具有抗氧化的能力,黄酮类化合物具有清除自由基的能力^[9];红茶菌菌种主要有乳酸菌、醋酸菌和酵母菌,其中乳酸菌是常见的益生菌^[10]。通过益生菌干预,可改善 CIRI 大鼠的肠道菌群丰度以及肠道通透性,并且能提高机体免疫力,减轻氧化应激,改善神经元损伤与患者认知功能^[11-14]。因此本文通过建立脑缺血再灌注大鼠模型,就红茶菌对脑缺血再灌注损伤是否有影响进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 动物

本动物实验所有动物均购买于新疆医科大学动物实验中心,体重 180-220 g 的清洁级 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 48 只,在清洁级实验环境、温度 22-24 °C、可自由获取食物和水的适应性饲养 7 天。

1.2 仪器与试剂

红茶菌液发酵方法^[15,16]准备 500 mL 95 °C 超纯水,加入白砂糖 50 g,普洱茶 3 g 后小火煮沸 10 min;冷却至室温后再用热超纯水将煮沸液体体积补满至 500 mL,并将残渣滤除;红茶菌菌种(太原红茶菌生物科技有限公司,中国)加入后,用牛皮

纸将瓶口封闭固定;室温下避光发酵 30 天,滤出发酵液备用。依达拉奉(扬子江药业有限公司,中国);水合氯醛(Biosharp, 中国);大鼠中动脉栓塞术线栓(北京西浓科技有限公司,中国);多聚甲醛固定液(Biosharp, 中国);5,2,3,5- 氯化三苯基四氮唑 TTC(SAGMA, 美国);戊二醛固定液(SPI25 %浓度, PBS 稀释至 2.5 %);苏木素染色液(Biosharp, 中国);伊红染色液(Biosharp, 中国);透射电子显微镜(JEOL JEM F200, 日本),光学显微镜(Leica, 德国)。

2 方法

2.1 分组

将 SD 大鼠按随机数字表法^[17]分组,分为:假手术组(Sham Group)、模型组(Model Group)、红茶菌组(Kombucha Group)、依达拉奉组(Edaravone Group)。方法:将 48 只大鼠编号后,从随机数字表抄录 48 个数字,每个数除以 4。并以余数 1、2、3、4 代表假手术组、模型组、红茶菌组、依达拉奉组,结果四组分别纳入 14 只、11 只、11 只和 12 只。随机数字表继续抄录两个数字,得 59、72,以 14 除之,余数为 3、2,就可以把假手术组第 13、14 只大鼠分别归入模型组和红茶菌组。

2.2 给药

红茶菌组大鼠术前连续红茶菌液灌胃 7 天,由大鼠换算公式可知,大鼠灌胃剂量为 1.34 mL/(200 g·d),换算为人给药剂量为 75 mL/(70 kg·d),即 6.7 mL/(kg·d)。灌胃时间为每天 10:00-11:00,再灌注麻醉清醒后追加灌胃一次;依达拉奉组在再灌注前 15 min,经腹腔注射依达拉奉,剂量为 2 mg/(200 g·d),换算为人给药剂量为 112 mg/(70 kg·d),即 10 mg(原液)/(kg·d);假手术组和模型组给予生理盐水。

2.3 模型制备

参考文献^[18,19],手术动物术前禁食禁水 12 h,10%水合氯醛行腹腔注射麻醉(0.35 mL/100 g),室温保持在 25 °C,取仰卧位固定于操作台上;颈部正中皮肤备皮后碘伏消毒,取纵行切口长约 1.5 cm,逐层钝性分离皮下组织、肌组织,暴露颈总动脉并将其游离至颈内颈外分叉处,将颈总动脉近心端结扎,在颈内颈外分叉稍下处剪一小口,将圆头直径 0.265 mm 的线栓插入,进入颈内动脉 18 mm 有轻微阻力后停止,扎紧固定线栓;2 h 后将线栓拔出,消毒并缝合皮肤。假手术组只分离颈总动脉。

2.4 神经行为学评分

大鼠 MCAO 24 h 后,按照 Zea Longa⁵ 级评分法进行大鼠神经行为学评分。评分标准见表 1。排除 4 分和 0 分者,纳入其余符合标准者。

2.5 脑组织梗死面积百分比测定

大鼠脑缺血再灌注 24 h 后,各组随机的抽取 3 只,麻醉后分离出全脑组织,以厚度为 2 mm 进行切片,切取 5 层,浸入

2 %的 TTC 中,避光染色 30 min 后拍照。白色为脑梗死区域, 茶菌组及依达拉奉组大鼠脑梗死面积占总面积的比例。红色为正常区域, Image J 软件用于计算假手术组、模型组、红

表 1 Zea Longa5 级评分法评分标准
Table 1 Longa's score and corresponding neurobehavioral manifestation

Score	Neurobehavioral manifestation
0	No deficit
1	Failure to extend right forepaw
2	Circling to the right
3	Falling to the right
4	No spontaneous walking with a depressed level of consciousness

2.6 组织固定、取材

每组随机抽取 3 只大鼠,腹腔注射 10 %水合氯醛麻醉,用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)行心内灌注后固定,随后快速断头取脑,4 %多聚甲醛固定后,HE 染色备用。再随机抽取 3 只大鼠,心内灌注固定后,2.5 % 戊二醛固定后透射电镜制片备用。

2.7 苏木素 - 伊红染色(HE 染色)

脑组织用 4 % 多聚甲醛固定 48 h 后石蜡包埋后,以冠状切片厚度为 4 μ m,二甲苯脱蜡 3 次,每次 5 min;后用乙醇梯度去除二甲苯;苏木素进行染色 3~5 min;进行冲洗,流水冲洗时间不少于 15 min,细胞核变为蓝色后即完成冲洗;伊红液进行染色,染色 0.5~1.0 min,乙醇脱水后透明,盖片封片;以 400 $\times$ 光镜视野下拍摄大鼠大脑皮层神经元。

2.8 透射电镜制片

用 2.5 %戊二醛前固定 1-2 h,用 PBS 清洗两次,各 10-15 min,蒸馏水洗一次 10-15 min 后用 1 %四氧化锇后固定 1-2 h,蒸馏水洗三次,每次 10-15 min;丙酮逐级梯度脱水;之后用丙酮及纯包埋剂浸透 16 h 后进行包埋,包埋步骤为:37 $^{\circ}$ C 包埋 12 h,

45 $^{\circ}$ C 包埋 12 h,60 $^{\circ}$ C 包埋 24 h。完成包埋后经半薄切片定位,将包埋块修成梯形,切成厚约 70 nm 切片。用醋酸铀染色 15-30 min,用蒸馏水洗涤三次以上,滤纸吸去多余水分,自然晾干后再行枸橼酸铅染色 5-30 min,清洗步骤同醋酸铀染色后清洗步骤。完成后透射电镜下观察大鼠大脑皮层神经元形态。

2.9 统计学处理

数据统计分析采用 SPSS 26.0 软件进行,计量资料表示为均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),多组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠神经行为学评分比较

假手术组大鼠未表现出神经功能损伤症状(0 ± 0),模型组大鼠神经行为学评分为(2.52 ± 0.52),红茶菌组大鼠神经行为学评分为(2.21 ± 0.60),依达拉奉组大鼠神经行为学评分为(2.01 ± 0.66);红茶菌组、依达拉奉组均低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.05$),见表 2。

表 2 红茶菌对脑缺血再灌注损伤大鼠神经行为学评分的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effects of Kombucha on neurobehavioral score of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury($\bar{x} \pm s$)

Groups	Amount(n)	Neurobehavioral Score
Sham Group	12	0 ± 0
Model Group	12	$2.52 \pm 0.52^*$
Kombucha Group	12	$2.21 \pm 0.60^*$
Edaravone Group	12	$2.01 \pm 0.66^*$

Note: compared with Sham group, $*P < 0.05$.

3.2 各组大鼠脑组织 TTC 染色结果

TTC 染色后,脑组织白色区域为梗死区,正常区域为红色。梗死面积使用 Image J 软件计算,假手术组梗死面积为 0,与神经功能的评分相对应;而模型组的梗死面积占比达(34.835 ± 2.13) %;本研究给予红茶菌和依达拉奉干预的大鼠梗死面积占比降低,红茶菌组为(17.268 ± 1.32) %,依达拉奉组(13.4 ± 1.21) %。与模型组相比,红茶菌组和依达拉奉组大鼠脑部梗死面积明显减少,证明红茶菌和依达拉奉可减少大鼠脑缺血再灌注损伤脑部梗死面积,见图 1。

3.3 HE 染色后大鼠脑组织病理形态学结果

通过大鼠大脑皮层的 HE 染色发现,假手术组的大脑皮层区神经元细胞结构完整、排列紧凑整齐,细胞核染色清楚;模型组神经元排列紊乱,细胞核固缩,细胞间质疏松,且有胶质细胞增生;相较模型组,依达拉奉组和红茶菌组损伤明显改善,大脑皮层神经元排列相对正常,核固缩减轻,相较红茶菌组,依达拉奉组改善更显著,见图 2。

3.4 电镜下大鼠皮层神经元超微结构及线粒体形态结果

电镜下观察,假手术组神经元体积大,核大而圆,核膜完

整,染色质均一、结构正常,胞质内线粒体双层膜结构清晰,板层状嵴排列规则整齐;模型组可见细胞核内染色质出现局部溶解,胞质内线粒体肿胀,嵴间隙增宽,局部嵴溶解;红茶菌组和依达拉奉组较模型组神经元损伤得到改善,细胞核内染色质分

布较均匀,未见明显溶解,胞质内线粒体肿胀减少,嵴结构相对完整,依达拉奉组改善效果更为明显。见图 3, A-D 中红色箭头标出为神经元特征性改变, E-H 红色箭头标出为线粒体特征性改变。

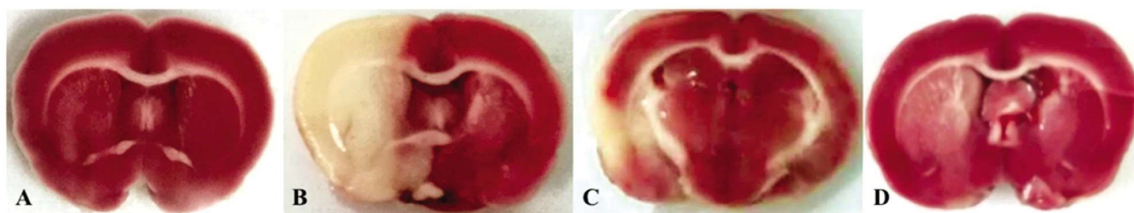


图 1 红茶菌对脑缺血再灌注大鼠脑组织梗死灶的影响

Fig.1 Effects of Kombucha on the infarction focus of rats with cerebral ischemia reperfusion

Note: A. Sham Group; B. Model Group; C. Kombucha Group; D. Edaravone Group.

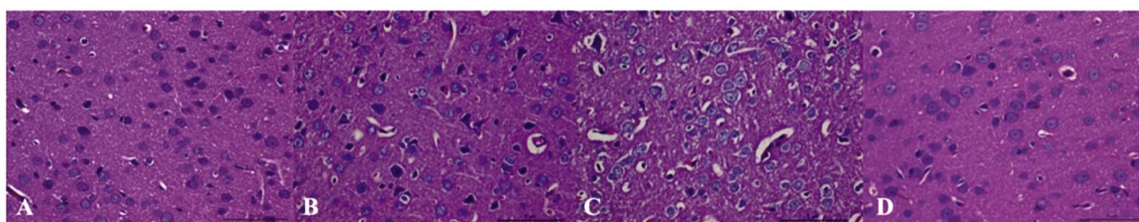


图 2 红茶菌对脑缺血再灌注大鼠皮层神经元病理形态学的影响(LM 放大倍率:400×)

Fig.2 Effect of kombucha on Pathomorphology of cortical neurons in rats with cerebral ischemia-reperfusion

(LM magnification: 400×)

Note: A. Sham Group; B. Model Group; C. Kombucha Group; D. Edaravone Group.

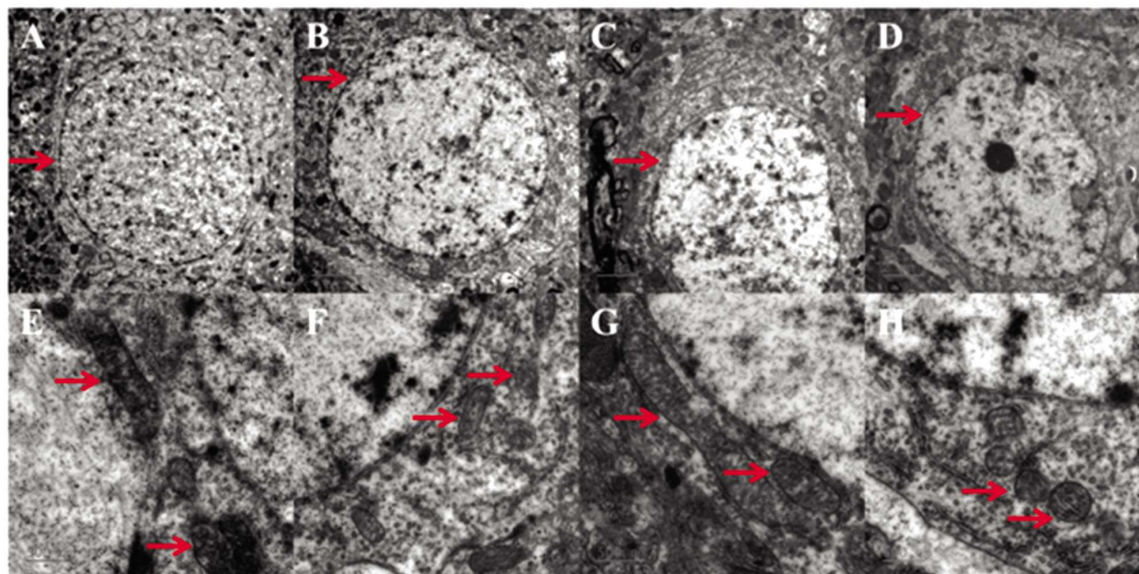


图 3 红茶菌对脑缺血再灌注大鼠皮层神经元超微结构及线粒体形态的影响

Fig. 3 Effects of Kombucha on ultrastructure and mitochondrial morphology of cortical neurons in rats with cerebral ischemia-reperfusion

Note: A, E. Sham Group; B, F. Model Group; C, G. Kombucha Group; D, H. Edaravone Group.

4 讨论

脑缺血再灌注损伤后大脑组织形态学发生明显变化^[20], TTC 染色脑梗区域呈白色, HE 染色后观察神经元排列不规则,细胞间质疏松且有胶质细胞的增生;神经元超微结构也发生较大改变,如染色质溶解,线粒体肿胀等。本实验采用线栓法制备大鼠脑缺血再灌注损伤模型,分别给予红茶菌和依达拉奉干预。红茶菌由酵母、醋酸菌和乳酸菌发酵而成,有特殊的营养

和保健功能,其中包含部分茶叶浸出物、发酵微生物及其代谢产物,包括醋酸、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、茶多酚、咖啡因、葡萄糖、果糖、蛋白质、氨基酸、维生素、黄酮类化合物等^[21,22]。茶多酚是一种纯天然的抗氧化剂,具有降血脂、抗突变及清除体内自由基等多种功能,李梅等^[23]在研究中总结了茶多酚对神经退行性疾病具有的保护作用,可减少脑缺血再灌注损伤的脑梗死面积;黄酮类化合物可以清除自由基,陈斌等^[24]的报告阐述了黄酮类化合物与肠道菌群可相互作用,改善肠道菌群组成,提高

肠道菌群丰度。Wanchao S 等^[13]研究发现,脑缺血再灌注损伤大鼠给予乳酸杆菌干预后,大脑损伤明显减轻,证明益生菌可通过 MGBA 对大脑产生积极影响^[25]。本实验结果显示脑缺血再灌注损伤后大鼠神经行为学评分增高,脑部梗死灶出现,神经元损伤严重,提示造模成功,与李东红等^[26]的研究结果一致。进一步观察 HE 染色结果与电镜结果发现:模型组神经元排列紊乱,神经元超微结构损伤严重,红茶菌组与依达拉奉组神经元损伤改善较明显,神经元排列较规则,水肿减轻。依达拉奉作为一种氧自由基清除剂,在脑卒中动物模型中发挥较强的神经保护作用,本研究中依达拉奉组改善脑损伤效果更显著,与谢明等^[27]、Yu H 等^[28]的研究结果一致。

综上,本研究通过形态学检测方法:TTC、HE 和透射电镜,观察大鼠大脑皮层神经元结构变化,发现给予大鼠红茶菌干预可减小脑梗死面积,减轻梗死区域细胞的损伤,初步揭示红茶菌对治疗脑缺血再灌注损伤可能有一定的效果,所以推测红茶菌可能通过以下两个途径改善脑损伤:红茶菌的发酵产物酚类物质和黄酮类化合物通过清除自由基、抗氧化的作用减轻脑损伤^[23,24];发酵红茶菌的主成分乳酸菌通过微生物-脑-肠轴影响肠道菌群,改善肠道免疫和吸收功能,继而减轻脑缺血再灌注损伤^[29]。故综合分析认为红茶菌可能成为治疗 CIRI 的疗法或辅助疗法。由于红茶菌主成分受多种因素影响,如菌种、茶叶种类、温度、发酵时间等^[29,30],未来将确定红茶菌减轻脑损伤作用的有效成分且提供实验数据支持,下一步工作将探讨其确切机制和测定相关指标。

参考文献(References)

- [1] Feske S K. Ischemic stroke[J]. *Am J Med*, 2021, 134(12): 1457-1464
- [2] 李兆珍, 张丹参. 脑缺血再灌注损伤相关机制的研究进展 [J]. *神经药理学*, 2020, 10(06): 60-63
- [3] Zhao X, Li S, Mo Y, et al. DCA Protects against Oxidation Injury Attributed to Cerebral Ischemia-Reperfusion by Regulating Glycolysis through PDK2-PDH-Nrf2 Axis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5173035
- [4] 李素萍, 许飞, 余能伟, 等. 莜术醇通过减轻大鼠氧化应激和海马神经元凋亡、抑制 JNK1 的活化保护大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(6): 1317-1322
- [5] Benakis C, Martin-Gallausiaux C, Trezzi J-P, et al. The microbiome-gut-brain axis in acute and chronic brain diseases [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2020, 61: 1-9
- [6] 王燕, 石剑, 贡丽雅, 等. "脑-肠轴"学说研究益生菌联合肠内营养对脑梗死大鼠免疫及认知功能的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(15): 3288-3292
- [7] Villarreal-Soto S A, Beaufort S, Bouajila J, et al. Understanding kombucha tea fermentation: A review [J]. *J Food Sci*, 2018, 83(3): 580-588
- [8] Permatasari H K, Nurkolis F, Augusta P S, et al. Kombucha tea from seagrapes () potential as a functional anti-ageing food: And study[J]. *Heliyon*, 2021, 7(9): e07944
- [9] YU J, BI X J, YU B, et al. Isoflavones: anti-inflammatory benefit and possible caveats[J]. *Nutrients*, 2016, 8(6): 361
- [10] Mu Q, Tavella V J, Luo X M. Role of in human health and diseases [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 757
- [11] Sun J, Wang F, Ling Z, et al. *Clostridium butyricum* attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulation of gut microbiota[J]. *Brain Res*, 2016, 1642: 180-188
- [12] Rahmati H, Momenabadi S, Vafaei A A, et al. Probiotic supplementation attenuates hippocampus injury and spatial learning and memory impairments in a cerebral hypoperfusion mouse model [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(5): 4985-4995
- [13] Wanchao S, Chen M, Zhiguo S, et al. Protective effect and mechanism of lactobacillus on cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(7): e7172
- [14] 陶豫东. 益生菌结合肠内营养干预纠正缺血性急性脑卒中患者肠道菌群紊乱的作用及其预后的影响 [J]. *广州医药*, 2022, 53(01): 109-113+124
- [15] 吴雅茗, 唐灵芝, 翁乐斌, 等. 红茶菌对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. *西北药学杂志*, 2017, 32(02): 175-180
- [16] 李先行, 杜昊炎, 冯志海. 红茶菌对阿司匹林致大鼠胃溃疡的保护作用及其机制研究[J]. *中医药信息*, 2021, 38(06): 55-58
- [17] 赵伟, 孙国志. 常用实验动物随机分组方法[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2009, (04): 61-62
- [18] McCabe C, Arroja M M, Reid E, et al. Animal models of ischaemic stroke and characterisation of the ischaemic penumbra [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134(Pt B): 169-177
- [19] Li Y, Zhang J. Animal models of stroke [J]. *Animal Model Exp Med*, 2021, 4(3): 204-219
- [20] 刘胜伟. 基于转录组学的 β -石竹烯抗脑缺血再灌注损伤的机制研究[D]. 重庆医科大学, 2021
- [21] 李晓敏, 王晴, 檀馨悦, 等. 红茶菌成分及功能研究进展[J]. *中国酿造*, 2020, 39(10): 5-10
- [22] Mousavi S M, Hashemi S A, Zarei M, et al. Recent progress in chemical composition, production, and pharmaceutical effects of kombucha beverage: A complementary and alternative medicine[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2020, 2020: 4397543
- [23] 李梅, 尚宇梅, 王智慧, 等. 茶多酚与神经退行性疾病的研究进展 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25(11): 1631-1634
- [24] 陈斌, 刘洁, 詹敏敏, 等. 黄酮类化合物与肠道菌群互作研究进展 [J]. *中国食品学报*, 2022, 22(6): 369-381
- [25] Doroszkiewicz J, Groblewska M, Mroczko B. The role of gut microbiota and gut-brain interplay in selected diseases of the central nervous system[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 10028
- [26] 李东红, 徐翠珊, 韩德恩, 等. 复方麝香黄芪滴丸中 7 个活性成分在正常大鼠和脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内药动学研究[J]. *中草药*, 2022, 53(15): 4746-4754
- [27] 谢明, 朱俊德, 周璐, 等. 依达拉奉对大鼠脑缺血再灌注损伤后氧化应激及凋亡的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2021, 37(04): 418-424
- [28] Yu H, Wu Z, Wang X, et al. Protective effects of combined treatment with mild hypothermia and edaravone against cerebral ischemia/reperfusion injury via oxidative stress and nrf2 pathway regulation[J]. *Int J Oncol*, 2020, 57(2): 500-508
- [29] Bortolomedi B M, Paglarini C S, Brod F C A. Bioactive compounds in kombucha: A review of substrate effect and fermentation conditions[J]. *Food Chem*, 2022, 385: 132719
- [30] 谭培科, 陈志周, 逯笑萌, 等. '红茶菌'发酵饮料生产工艺及其功能特性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(21): 8359-8367