

双歧杆菌对慢性腹泻猕猴肠道微生物组的影响

宋佳蓉¹, 尚可², 雷光伦³, 刘旭²,
杨盛智¹, 胡刚³, 岳碧松^{1,2}, 范振鑫^{1,2}

1. 四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;
2. 四川大学生命科学学院 四川省濒危野生动物保护生物学重点实验室, 成都 610065;
3. 四川格林豪斯生物科技有限公司, 眉山 610081)

摘要: 本研究旨在结合高通量测序和平板计数实验探索含活性双歧杆菌(*Bifidobacterium* spp)的饲料对慢性腹泻猕猴(*Macaca mulatta*)肠道微生物多样性及其腹泻症状的影响。通过16S rRNA高通量测序对比分析添加双歧杆菌前后饲料的菌群组成,发现添加组双歧杆菌的相对丰度显著高于未添加组($P < 0.05$)。向慢性腹泻猕猴投喂该饲料,一个月后收集粪便进行宏基因组测序,并与前期研究获得的未添加组慢性腹泻猕猴和健康猕猴的肠道宏基因组数据对比分析,发现添加组的肠道菌群中乳杆菌(*Lactobacillus* spp)相对丰度较未添加组显著上调($P < 0.05$),与健康组无显著差异($P > 0.05$)。最后对饲喂双歧杆菌后好转及持续腹泻猕猴的粪便进行乳杆菌平板计数实验,发现经饲喂,猕猴肠道中乳杆菌数量增加,验证了宏基因组测序分析的结果。

关键词: 猕猴; 双歧杆菌; 腹泻; 宏基因组; 肠道菌群

中图分类号: Q93 文献标识码: A DOI: 10.19907/j.0490-6756.2022.066003

The effects of *Bifidobacterium* on the gut microbiome of macaques with chronic diarrhea

SONG Jia-Rong¹, SHANG Ke², LEI Guang-Lun³, LIU Xu²,
YANG Sheng-Zhi¹, HUGang³, YUE Bi-Song^{1,2}, FAN Zhen-Xin^{1,2}

1. Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;
2. Key Laboratory of Conservation Biology on Endangered Wildlife of Sichuan Province, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;
3. Sichuan Green-house Biotech Co., Ltd., Meishan 610081, China)

Abstract: This study aims to explore the effects of *Bifidobacterium* spp on intestinal microbial diversity and diarrhea symptoms of *Macaca mulatta* in chronic diarrhea with high-throughput sequencing and plate counting experiments. The relative abundance of added bifidobacteria was significantly higher than that of the unaddressed group ($P < 0.05$) by comparative analysis of the 16S rRNA high-throughput sequencing. The feed was fed to the chronic diarrhea macaques, and then the feces were collected for metagenomic sequencing a month later, and compared with the intestinal metagenomic data of the unad-

收稿日期: 2022-03-30

基金项目: 国家自然科学基金(32070413)

作者简介: 宋佳蓉(1999-),女,辽宁大连人,硕士研究生,研究方向为微生物学. E-mail: songjr512@126.com

通讯作者: 范振鑫. E-mail: zxfan@scu.edu.cn

dressed group of chronic diarrhea and healthy macaques which were obtained in the previous study. It was found that the relative abundance of *Lactobacillus spp* in the intestinal flora of the added group was significantly upregulated compared with that of the unaddressed group ($P < 0.05$). And there was no significant difference with the healthy group ($P > 0.05$). Finally, the plate counting experiment of *Lactobacillus* was performed on the faces of improved macaques and persistent diarrhea. It was found that the number of *Lactobacillus* in the intestines of macaques increased after feeding, validating the result of metagenomic sequencing analysis.

Keywords: *Macaca mulatta*; *Bifidobacterium spp*; Diarrhea; Metagenomics; Gut microbiota

1 引言

猕猴(*Macaca mulatta*)属于灵长目猴科动物,因其与人类的遗传相似性极高,在医学和生物领域中常作为理想的实验动物.目前人工圈养的猕猴主要以饲料为食,辅以水果、蔬菜等.圈养猕猴所患常见病为病毒性传染病、寄生虫病以及腹泻,其中多以腹泻为主^[1].在饲养的过程中猕猴常因肠道内感染细菌而产生肠道疾病,轻则短期腹泻,严重者长期腹泻甚至死亡^[2].

圈养猕猴的肠道微生物组与发展中国家的人类相似,因此作为模式动物被广泛应用于人类肠道疾病的研究中^[3],然而圈养猕猴的慢性腹泻问题一直难以被攻克.该病不仅会造成幼年猕猴发育迟缓,免疫功能下降,还可能导致猕猴结肠感染^[4],甚至会引发反应性关节炎等相关慢性疾病^[5],这对猕猴的身体健康造成了极大威胁.猕猴腹泻治疗方式为注射、投药和输液等^[6],但由于注射和输液操作困难,目前大多采取投药的形式,药物以抗生素为主.但临床发现抗生素治疗腹泻效果不佳^[7],同时世卫组织(WHO)也表示长期使用抗生素治疗会导致抗生素相关性腹泻(AAD)^[8].

随着肠道致病菌对抗生素的抗性逐渐增加,益生菌协助治疗的方式成为了目前的热点.益生菌作为一类定植于肠道内的活性微生物,在数量充分的情况下对宿主的肠道健康有益^[9].当前市场上被广泛使用的益生菌包括乳杆菌、酵母菌(*Saccharomyces*)和双歧杆菌(*Bifidobacterium spp*)等.双歧杆菌作为益生菌是人类和动物肠道菌群的主要组成部分之一^[10],被证实具有调节胃肠道微生物组、辅助治疗胃肠和其他多种疾病的功能.据报道,患有胃肠道疾病患者的肠道菌群中双歧杆菌含量低于健康人的水平^[11].该菌通过产生如丁酸等短链脂肪酸盐来改善肠道屏障功能^[12],其主要功能是帮助宿主消化食物,特别是哺乳动物饮食中的复合

碳水化合物^[13],同时在调节炎症反应、能量稳态和葡萄糖及脂类代谢方面也发挥着重要作用^[14].有研究指出短双歧杆菌和长双歧杆菌皆可降低病原体在宿主肠上皮细胞产生的毒性^[15].此外,双歧杆菌可分泌生物活性因子,刺激人体 SLC26A3 基因,帮助该基因在肠上皮细胞表达,使其控制 Cl^- 交换以维持水和电解质平衡^[16],从而避免引发腹泻^[17].哥本哈根大学的一项研究中使用动物双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌来协助治疗严重营养不良的乌干达儿童,发现经治疗的儿童肠道菌群与健康个体间表现出相似性,腹泻患儿肠道中的致病菌数量减少^[18].

本课题组前期针对圈养幼年猕猴的慢性腹泻问题展开了研究,通过对 11 只慢性腹泻的幼年猕猴与 18 只健康猕猴的粪便进行宏基因组测序,从肠道菌群的结构、功能及耐药性研究猕猴慢性腹泻的机制^[19].研究发现慢性腹泻猕猴的肠道微生物中约氏乳杆菌(*L. johnsonii*)、罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)和淀粉乳杆菌(*L. amylovorus*)等益生菌的相对丰度显著低于健康猕猴,同时慢性腹泻猕猴的抗生素耐药基因总丰度显著高于健康猕猴,表明慢性腹泻猕猴的肠道微生物的组成出现了显著的改变,特别是益生菌的显著减少和耐药基因的增加使得以抗生素为主的传统治疗效果不佳,慢性腹泻难以治愈.

本次研究的腹泻猕猴使用抗生素治疗数个疗程后仍效果不佳,基于课题组前期研究可知,慢性腹泻猕猴肠道菌群对头孢霉类抗生素及四环素类抗生素等产生耐药性且菌群结构被破坏,我们推断添加双歧杆菌可能会改善慢性腹泻猕猴的肠道菌群结构,促使其肠道菌群恢复到正常水平,从而有利于治疗和康复.本实验首先将活性双歧杆菌在常温下与普通颗粒饲料混合重新压制成型,首先通过 16S rRNA 测序对加工后的饲料菌群结构进行分析,再结合宏基因组测序分析饲喂双歧杆菌一个月

后的腹泻猕猴肠道菌群变化, 最后使用马氏平板对乳杆菌进行计数实验来验证宏基因组学的分析结果. 我们期待本研究能从益生菌改善肠道菌群结构的角度, 为圈养猕猴腹泻疾病的防治提供帮助.

2 材料与amp;方法

2.1 材料

本研究中的所有猕猴为四川格林豪斯生物科技有限公司(驯养繁殖许可证: 2003 驯繁 01-64 号)饲养的圈养猕猴. 其中 6 只幼年猕猴于 2021 年 8 月开始由于腹泻在兽医室进行单笼饲养和治疗, 前期经过给予抗生素治疗(氟苯尼考、头孢、左氧氟沙星、甲硝唑)后, 动物久治不愈, 进而转变为慢性腹泻, 后期向饲料中添加由市场购入的活性双歧杆菌(山东创益生物科技有限公司)进行辅助治疗, 同时对脱水病猴采用补液等措施进行治疗. 结合课题组前期研究得到的 18 只健康猕猴和饲喂未添加双歧杆菌饲料的 11 只慢性腹泻猕猴的肠道宏基因组数据进行对比分析^[19].

2.2 方法

2.2.1 16S rRNA 基因高通量测序分析添加双歧杆菌前后饲料菌群结构的变化 提取样本基因组 DNA 并以其作为模板, 根据测序区域的选择, 使用带 Barcode 的特异引物、New England Biolabs 公司的 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶进行 PCR. 引物选择 16S rDNA 可变区中的 V4 区: 515F (5'-CCTA-YGGGRBGCASCAG-3') 和 806R (5'-GGACT-ACNNGGGTATCTAAT-3'). 对扩增后产物进行 2% 浓度琼脂糖凝胶电泳, 选取质量合格的 DNA 使用磁珠纯化并通过酶标定量检测 PCR 产物, 使用胶回收盒回收质量合格的 DNA. 再使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建并完成质检, 样本送至诺禾致源生物科技有限公司通过 Illumina MiSeq 测序平台完成测序. 最后使用生物信息分析软件 QIIME2 对数据进行去噪, 完成 OTU 聚类并对代表序列进行注释, 最后进行物种注释、Alpha 多样性分析等下游分析工作.

2.2.2 宏基因组分析饲喂双歧杆菌前后腹泻猕猴肠道菌群结构的变化 根据试剂盒说明提取粪便总 DNA, 对其浓度和质量进行检测. 以基因组总 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 73 °C 30 s, 72 °C 1 min, 25 个循

环, 每个循环降低 1 °C; 94 °C 30 s, 48 °C 30 s, 72 °C 1 min, 10 个循环; 72 °C 7 min^[20]. 扩增完成后, 使用 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳检测样本纯度并通过 DNA 胶回收盒切胶回收质量合格的 DNA. 利用 Covaris 超声波破碎仪随机打断成约 300 bp 长的片段, 再经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等完成文库制备^[21] 并对文库进行质检^[22], 质检合格的样本送至诺禾致源生物科技有限公司进行测序.

使用 fastqc 软件去除污染和接头序列并对序列进行拼接组装; 使用 Kraken2 软件进行物种注释; 运用注释后得到的物种信息完成主成分分析、Alpha 多样性分析及 LEFse 差异分析.

2.2.3 平板稀释计数 分别称取饲喂双歧杆菌后有好转的猕猴粪便及持续腹泻的猕猴粪便样本各 0.1 g 并编号; 向样本中添加 2 mL 生理盐水 (0.9% NaCl), 充分震荡制成原液; 按各样本 7 支 5 mL 试管排列并依次编号, 各加入 180 μ L 生理盐水; 吸取原液 200 μ L 移至 1 号试管, 依次按悬液和生理盐水 1 : 9 的比例对原液构建浓度稀释梯度; 取编号 3、5、7 的试管作为最终所用梯度, 并各取 20 μ L 涂于马氏培养基; 置于 37 °C 恒温培养箱中厌氧培养 24 h 后进行计数.

3 结果

3.1 添加双歧杆菌后猕猴饲料的菌群结构变化

为了验证添加组饲料的双歧杆菌活性, 我们收集 3 个未添加双歧杆菌的饲料和 3 个添加双歧杆菌的饲料作为样本进行 16S rRNA 基因高通量测序, 经主成分分析表明未添加组 (SL) 与添加双歧杆菌组 (YSJ) 饲料的菌群结构差异明显 (图 1a); 在门 (图 1d) 和属 (图 1e) 两个水平分别对两组饲料所含菌群的物种堆积图进行分析, 发现 YSJ 组双歧杆菌属的相对丰度高于 SL 组. LEFse 分析也指出双歧杆菌为两组饲料的差异菌, 且双歧杆菌属富集在 YSJ 组 (图 1c). 由此证明双歧杆菌在添加至饲料后仍保持活性, 为后续可使用该饲料投喂慢性腹泻猕猴来调节其肠道菌群提供了保证.

在门水平上, YSJ 组排名前三的成员为蓝藻门 (Cyanobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria); 而 SL 组排名前三的成员为蓝藻门、变形菌门和厚壁菌门 (Firmicutes). 两组相对丰度排名第一的门相同, 皆为蓝藻门. YSJ 组放线菌门的相对丰度显著高于 SL 组, 而厚壁菌

门的相对丰度则低于 SL 组(图 1d). 在属水平上, 两组丰度第一的属相同, 皆为链藻菌属(*Streptophyta*)(图 1e). SL 组相对丰度排名第二的属为立克次氏体目(Rickettsiales)成员, 而 YSJ 组相对丰度排名第二的成员为双歧杆菌属. 双歧杆菌属为放线菌门成员, 这与门水平中展现的相对丰度排名相似. 此外, YSJ 组中的芽孢杆菌属(*Bacillus Cohn*)、乳酸乳球菌属(*Lactococcus*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)的相对丰度低于 SL 组. 结果表明向饲料中添加活性双歧杆菌后, 双歧杆菌的相对丰度显著升高.

经 Alpha 多样性分析可知 SL 组和 YSJ 组间

的 shannon 指数无显著性差异($P>0.05$)(图 1b), 即两组饲料的菌群多样性相近. 在属水平上对两组饲料的菌群进行 LEFse 差异分析, 结果表明两组间双歧杆菌的相对丰度差异显著($P<0.05$), 双歧杆菌属主要富集到 YSJ 组, 扭鞘藻目成员(*Streptophyta*)、立克次氏体目、芽孢杆菌目、乳酸乳球菌属、乳杆菌属及布劳特氏菌属(*Blautia*)等富集到 SL 组(图 1c), 这与物种注释后的物种堆积对比图中得到的结果一致. 以上结果表明, YSJ 组饲料中的双歧杆菌及其他益生菌的相对丰度高于 SL 组, 将双歧杆菌添加至饲料中仍可保持其活性.

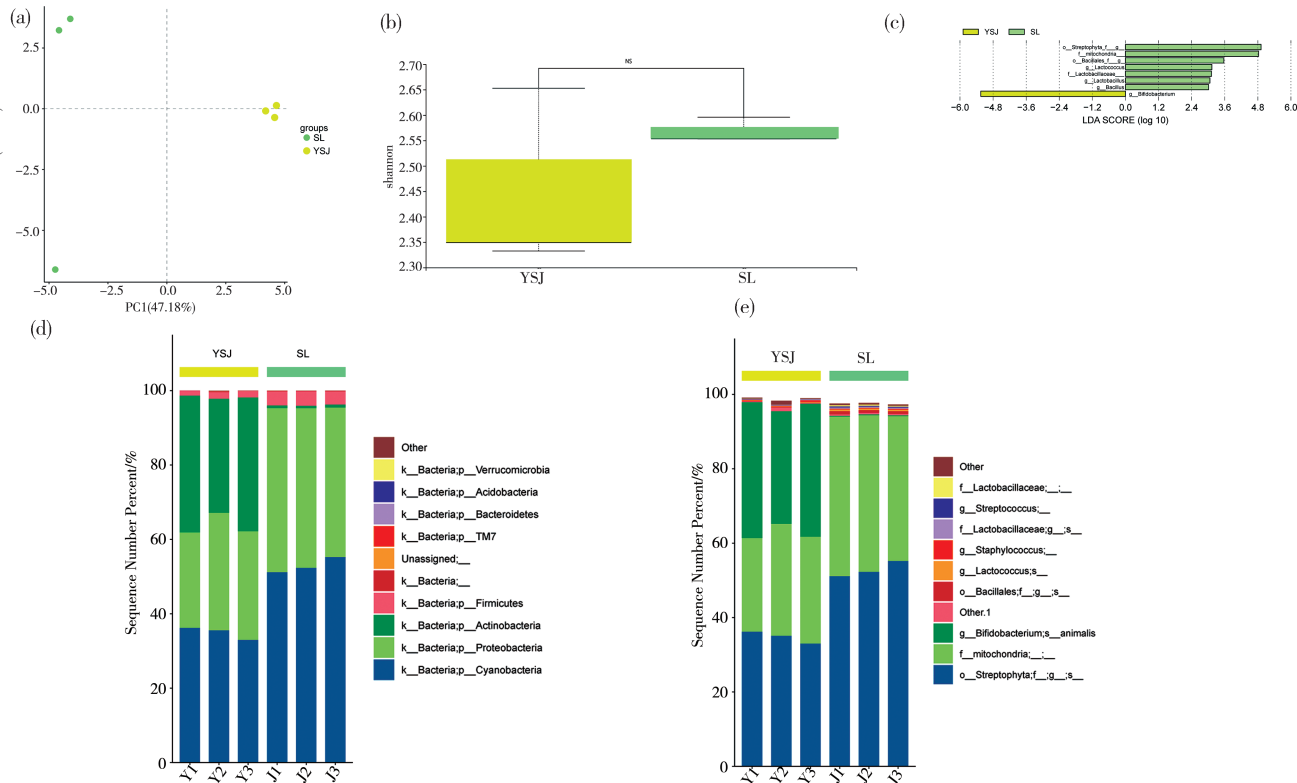


图 1 两组饲料样本的菌群结构差异

(a)主成分分析图;(b)饲料组间 Alpha 多样性指数;(c)差异显著的菌群;(d)和(e)分别为门水平和属水平上未添加与添加双歧杆菌饲料样本的物种堆积图

Fig. 1 The difference in flora structure between the two groups of feed samples

(a) PCA; (b) alpha diversity; (c) relative abundance by LEFSe; the main bacterium in the feed with or without bifidobacterium on Division level (d) and genus level (e)

($P<0.05$ and $LDA>3$, $^{NS}P\text{-value}>0.05$, $^*P\text{-value}<0.05$, $^{**}P\text{-value}<0.01$, $^{***}P\text{-value}<0.001$)

3.2 腹泻猕猴与饲喂双歧杆菌猕猴肠道菌群结构的对比分析

采集 6 只饲喂添加了双歧杆菌饲料的慢性腹泻幼年猕猴的粪便作为样本进行了宏基因组测序, 并联合课题组前期研究中的 18 只健康幼年猕猴及饲喂未添加双歧杆菌饲料的 11 只慢性腹泻的幼年猕猴的粪便宏基因组数据进行对比分析. 结果表明

饲喂双歧杆菌后, 慢性腹泻猕猴的肠道菌群中的致病菌相对丰度降低, 乳杆菌等益生菌的相对丰度显著升高, 肠道菌群结构恢复至健康水平, 猕猴长期腹泻的状态有所好转.

经主成分分析, 无症状组 (Asymptomatic) 与腹泻组 (Diarrheal) 的肠道菌群结构差异较大, 饲喂双歧杆菌组 (Probiotic) 与 Asymptomatic 组重合

(图 2e), 表明饲喂双歧杆菌后的腹泻猕猴的肠道菌群已恢复至健康水平. 分别对三组猕猴中乳杆菌属和双歧杆菌属的相对丰度进行 Alpha 多样性分析, 发现 Diarrheal 组中双歧杆菌属的相对丰度高于 Asymptomatic 组和 Probiotic 组, 且差异显著 ($P <$

0.05), 而 Asymptomatic 组和 Probiotic 组则无显著性差异 ($P >$ 0.05) (图 2d). Probiotic 组中乳杆菌的相对丰度与 Asymptomatic 组无显著性差异 ($P >$ 0.05), 而 Diarrheal 组中乳杆菌的相对丰度低于 Probiotic 组, 表现出显著性差异 ($P <$ 0.05) (图 2c).

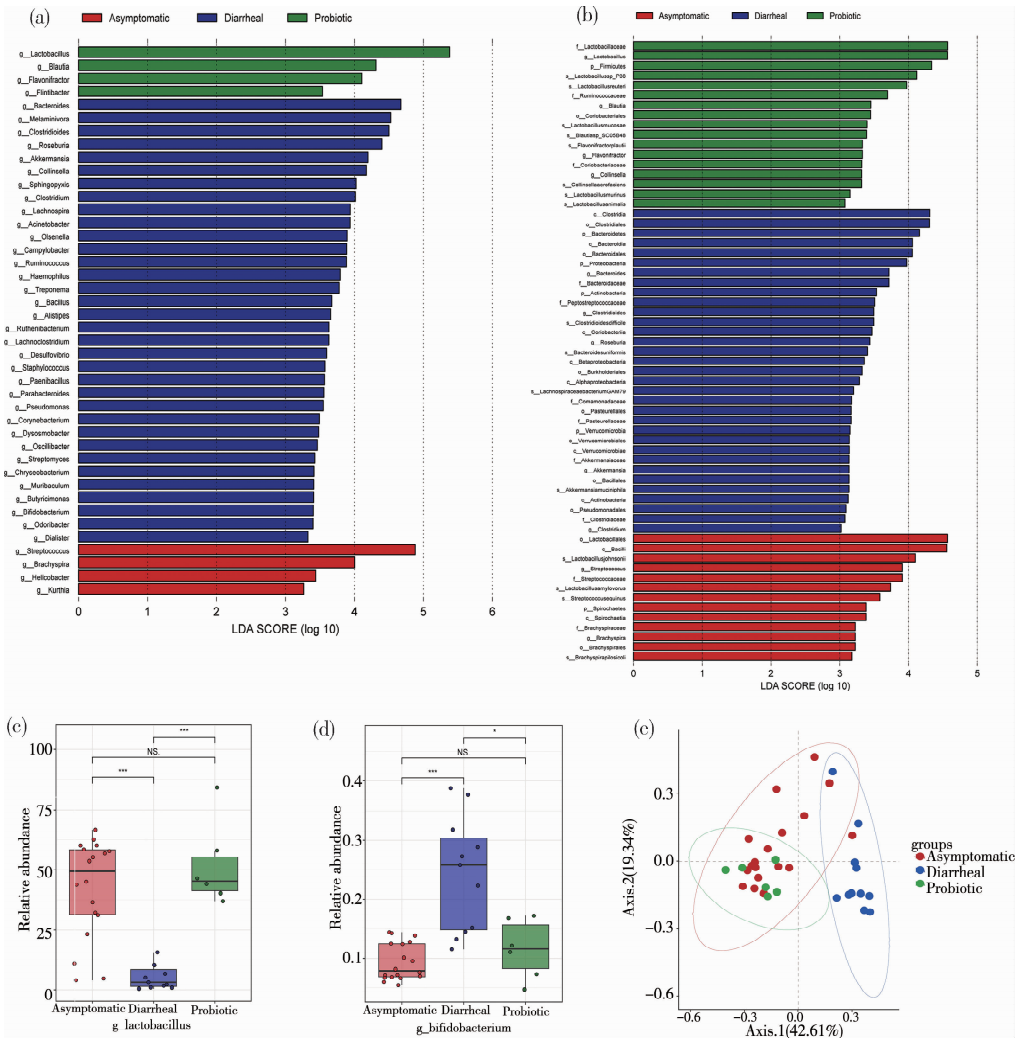


图 2 三组粪便样本的菌群结构差异

(a)和(b)分别表示属水平和种水平上差异显著的细菌;(c)和(d)分别表示乳酸菌和双歧杆菌的组间 Alpha 多样性指数;(e)主成分分析图

Fig. 2 The difference in flora structure between the three groups of feces samples

The difference of genus-level (a) and species-level (b) relative abundance by LEfSe; the comparison of genus-level bifidobacterium (c) and lactobacillus (d); (e) PCA

($P <$ 0.05 and $LDA >$ 3, NS P -value $>$ 0.05, * P -value $<$ 0.05, ** P -value $<$ 0.01, *** P -value $<$ 0.001)

此外, 通过使用 LEfse 分析来展示三组间的差异菌群. 在属水平上, 假单胞杆菌属、梭状芽胞杆菌 (*Clostridium*) 以及葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 等肠道中常见的致病菌富集到 Diarrheal 组; 乳杆菌属和布劳特氏菌属等富集到 Probiotic 组; 螺旋杆菌属 (*Helicobacter*)、短螺旋体菌属 (*Brachyspira*) 和链球菌属 (*Streptococcus*) 等富集到 Asymptomatic 组 (图 2a). 在种水平上, 罗伊氏乳杆菌、黏

膜乳杆菌 (*L. mucosae*) 和动物乳杆菌 (*L. animalis*) 等富集于 Probiotic 组, 艰难梭状芽胞杆菌 (*Clostridium difficile*) 富集于 Diarrheal 组 (图 2b). 结果表明, 饲喂双歧杆菌后腹泻猕猴肠道菌群中致病菌的相对丰度显著降低, 而益生菌的相对丰度显著升高; 在饲喂双歧杆菌后出现于无腹泻症状猕猴肠道菌群中的短螺旋体等致病菌的相对丰度显著降低.

3.3 饲喂双歧杆菌后猕猴肠道菌群中的乳杆菌计数实验

为验证宏基因组测序的结果,我们对饲喂双歧杆菌后有好转的慢性腹泻猕猴与持续腹泻猕猴粪便中的乳杆菌进行马氏平板稀释计数实验. 经实验

发现,饲喂双歧杆菌后腹泻好转组(Recover)的乳杆菌数量约为持续腹泻组(Sick)的 10^3 倍(表 1),乳杆菌含量显著增加. 结果表明双歧杆菌的添加有助于慢性腹泻猕猴的肠道菌群中乳杆菌含量的增加,对慢性腹泻猕猴的肠道菌群恢复有帮助.

表 1 粪便中乳杆菌的数量

Tab. 1 The amount of lactobacillus in the stool

Tag of stools	Recover						Sick					
	ZG19092R	ZF20421R	ZF20146R	ZF20358R	ZG18001R	ZF20161R	ZG18575R	ZG19070R	ZF20364R	13824A	06384	ZF20370R
Number (CFU/g)	2.9×10^{13}	1.7×10^{13}	5.0×10^{10}	8.6×10^{13}	1.7×10^{13}	1.4×10^{10}	8.6×10^{10}	1.7×10^{10}	4.6×10^{10}	2.13×10^6	1.39×10^{10}	1.96×10^6

4 讨论

本实验共研究了 35 只圈养猕猴,其中包括 6 只无症状猕猴、11 只饲喂含双歧杆菌饲料的慢性腹泻猕猴及 18 只饲料中未添加双歧杆菌的慢性腹泻猕猴,通过宏基因组测序对比分析三组幼年猕猴的肠道菌群结构,发现双歧杆菌可以改善猕猴慢性腹泻的症状,促使其肠道菌群恢复至健康水平. 同时经猴场反馈,在饲喂双歧杆菌后,腹泻猕猴粪便成型且无拉稀情况.

圈养猕猴的长期腹泻由多种原因所致,除了受生活环境和饮食影响,病原体入侵导致的肠道微生物失调也是重要的内在原因^[23]. 在面对其慢性腹泻问题时,绝大部分猴场多采用投喂抗生素的方式进行治疗. 但研究表明,抗生素类药物对慢性腹泻治疗效果有限^[24]. 我们在对猕猴肠道菌群进行宏基因组分析时发现,假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)、梭状芽胞杆菌(*Clostridium*)以及葡萄球菌属(*Staphylococcus*)等肠道致病菌主要富集于未饲喂双歧杆菌的腹泻组,而饲喂了双歧杆菌的腹泻猕猴肠道菌群中的肠道致病菌含量大幅降低. 假单胞杆菌、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)与沙门氏菌(*Salmonella*)、志贺氏菌(*Shigella*)^[6]及大肠杆菌(*Escherichiacoli*)均为引起腹泻的常见病原菌^[25]. 假单胞杆菌虽不是慢性腹泻的主要致病菌,但腹泻患者粪便中仍表现出较高的携带率^[26]. 与假单胞杆菌相比,梭状芽胞杆菌引发慢性腹泻的概率更高,其中艰难梭状芽胞杆菌的毒力最强,一旦进入肠道该菌就会分泌两种葡萄糖基化毒素,从而引起炎症和腹泻^[27],本次实验也从未饲喂双歧杆菌的腹泻猕猴粪便中检测到了艰难梭状芽胞杆菌的存在.

由于婴儿出生后以母乳获取营养,母乳喂养导

致双歧杆菌占主导地位,双歧杆菌可分解母乳低聚糖(HMO)^[28],该物质在婴儿肠道中作为益生基质发挥重要的作用. 一项对腹泻儿童的治疗实验表明,向腹泻儿童补充益生菌后可缩短儿童的住院时间,改善粪便状态^[29]. 补充益生菌后,儿童肠道菌群中双歧杆菌和乳杆菌的相对丰度显著上调. 而圈养的幼年恒河猴的肠道菌群组成与发展中国家的人类婴儿组成相似^[30],于是本实验选用双歧杆菌作为添加剂来饲喂慢性腹泻的幼年猕猴,推断双歧杆菌可对幼年猕猴的肠道菌群结构发挥同样的积极作用. 本研究的结果与上述提到的腹泻儿童实验结果相似,双歧杆菌的添加使腹泻猕猴的肠道菌群中乳杆菌的含量增加,假单胞杆菌和梭状芽胞杆菌等肠道致病菌的含量降低,肠道菌群由紊乱恢复至健康水平. 但值得注意的是,未饲喂双歧杆菌的腹泻猕猴的肠道菌群中双歧杆菌的含量远超过于饲喂了双歧杆菌的腹泻猕猴,推测该情况是由于双歧杆菌的添加使腹泻猕猴的肠道菌群中其他益生菌的丰度上调,从而造成总丰度值发生改变,使双歧杆菌的相对丰度下调.

实验结果中罗伊氏乳杆菌、黏膜乳杆菌和布劳特氏菌等益生菌的含量增加同样体现了双歧杆菌对慢性腹泻猕猴肠道菌群调节的功能. 黏膜乳杆菌可产生针对革兰氏阴性病原体的抗菌物质^[31],并抑制结肠炎标志物 NF- κ B 的激活^[32]. 布劳特氏菌作为一种具有新型潜在益生菌特征的厌氧细菌^[33]可抑制肥胖儿童肠道中的促炎细胞因子表达^[34],更重要的是该菌可通过产生细菌素来抑制肠道致病菌定植^[33],这有助于改善由于腹泻导致的肠道菌群紊乱. 然而也有相关研究曾表明在肠易激综合征和溃疡性结肠炎患者的粪便中布劳特氏菌属丰度高于健康人水平^[35]. 目前对于布劳特氏菌的益生性能并没有十分深入的研究,仍需要从种水平研

究该菌属对哺乳动物疾病的影响。

综上所述,本研究的结果表明双歧杆菌有助于慢性腹泻猕猴肠道菌群的恢复。YSJ 组饲料中的双歧杆菌相对丰度远高于 SL 组,保证了添加双歧杆菌组的腹泻猕猴摄入充足的活性双歧杆菌。经饲喂含双歧杆菌的饲料后,慢性腹泻猕猴肠道菌群中乳杆菌的丰度趋于健康水平,且肠道菌群结构恢复至健康状态,还可能有利于其他益生菌如布劳特氏菌等在肠道中的定植。因此,日后针对圈养猕猴腹泻情况可通过在饲料中添加双歧杆菌等益生菌进行辅助治疗。同时,我们发现健康组猕猴的肠道菌群中存在螺杆菌属、短螺旋菌属和链球菌属等条件致病菌,以上菌属对健康猕猴的肠道也存在隐患。由于实验样本量较少,且饲喂情况的观察时间较短,未能获得充分的数据结果。同时,因 DNA 不易降解,所以 16S rRNA 基因高通量测序所得数据与真实结果间存在误差。本次宏基因组分析得到的具有益生特性的细菌及健康组中富集的致病菌仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 顾宏伟. 猕猴饲养及常见病防治[J]. 兽医导刊, 2021(1): 124.
- [2] 祁明普, 汪乾坤, 陈颖钰, 等. 非人灵长类病毒性腹泻病研究进展[J]. 中国兽医学报, 2017, 37: 183.
- [3] Turnbaugh P J, Ley R E, Hamady M, *et al.* The human microbiome project [J]. *Nature*, 2007, 449: 804.
- [4] Sestak K, Merritt C K, Borda J, *et al.* Infectious agent and immune response characteristics of chronic enterocolitis in captive rhesus macaques [J]. *Infect Immun*, 2003, 71: 4079.
- [5] Li Y, Xia S, Jiang X, *et al.* Gut microbiota and diarrhea: an updated review [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 625210.
- [6] 耿志贤, 时彦胜, 孙兆增, 等. 猕猴腹泻治疗操作与护理[J]. 中国畜禽种业, 2009, 5: 72.
- [7] 周建华, 范春梅, 李志雄. 中西药合治猕猴奇异变形杆菌性腹泻的临床观察[J]. 福建畜牧兽医, 2005 (5): 12.
- [8] Lynne V, Shan G. Preventing pediatric antibiotic-associated diarrhea and clostridium difficile infections with probiotics: A metaanalysis [J]. *WJMA*, 2013, 1: 102.
- [9] Hoffman F A, Heimbach J T, Sanders M E, *et al.* Executive summary: scientific and regulatory challenges of development of probiotics as foods and drugs [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46: S53.
- [10] Gromova L V, Ermolenko E I, Sepp A L, *et al.* Gut digestive function and microbiome after correction of experimental dysbiosis in rats by indigenous bifidobacteria [J]. *Microorganisms*, 2021, 9: 522.
- [11] Golfetto L, De Senna F D, Hermes J, *et al.* Lower bifidobacteria counts in adult patients with celiac disease on a gluten-free diet [J]. *Arq Gastroenterol*, 2014, 51: 139.
- [12] Rios-Covian D, Gueimonde M, Duncan S H, *et al.* Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2015, 362: fnv176.
- [13] Armstrong Z, Mewis K, Liu F, *et al.* Metagenomics reveals functional synergy and novel polysaccharide utilization loci in the *Castor canadensis* fecal microbiome [J]. *ISME J*, 2018, 12, 2757.
- [14] Olivares P, Pacheco A, Aranha L, *et al.* Gut microbiota of adults with different metabolic phenotypes [J]. *Nutrition*, 2021, 90: 111293.
- [15] Valdés-Varela L, Alonso-Guervos M, García-Suárez O, *et al.* Screening of bifidobacteria and lactobacilli able to antagonize the cytotoxic effect of clostridium difficile upon intestinal epithelial HT29 monolayer [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 577.
- [16] Ray D, Alpini G, Glaser S. Probiotic Bifidobacterium species: potential beneficial effects in diarrheal disorders. Focus on "Probiotic Bifidobacterium species stimulate human SLC26A3 gene function and expression in intestinal epithelial cells" [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 307: c1081.
- [17] Kumar A, Hecht C, Priyamvada S, *et al.* Probiotic Bifidobacterium species stimulate human SLC26A3 gene function and expression in intestinal epithelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 307: c1084.
- [18] Castro-Mejía J L, OFerrall S, Krych L, *et al.* Restoration of gut microbiota in Ugandan children administered with probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12) during treatment for severe acute malnutrition [J]. *Gut Microbes*, 2020, 11: 855.
- [19] Yang S, Liu Y, Yang N, *et al.* The gut microbiome and antibiotic resistome of chronic diarrhea rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and its similarity to

- the human gut microbiome [J]. *Microbiome*, 2022, 10: 29.
- [20] 熊彩云, 许波, 戴利铭, 等. 倭蜂猴粪便微生物苯酚羟化酶和邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因多样性研究[J]. *微生物学通报*, 2015, 42: 2189.
- [21] 潘梦, 肖璐, 林毅, 等. 利用宏基因组方法对四川地区规模化养猪场粪便中耐药基因污染特征的研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2021(18): 58.
- [22] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. [J]. *Nat Methods*, 2013, 10: 57.
- [23] Prongay K, Park B, Murphy SJ. Risk factor analysis may provide clues to diarrhea prevention in outdoor-housed rhesus macaques (*Macaca mulatta*) [J]. *Am J Primatol*, 2013, 75: 872.
- [24] Westreich S T, Ardeshir A, Alkan Z, *et al.* Fecal metatranscriptomics of macaques with idiopathic chronic diarrhea reveals altered mucin degradation and fucose utilization [J]. *Microbiome*, 2019, 7: 41.
- [25] Rothschild B M. Primate spondyloarthropathy [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2005, 7: 173.
- [26] Chuang C H, Janapatla R P, Wang Y H, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*-associated diarrheal diseases in children [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2017, 36: 1119.
- [27] Anjuwon-Foster B R, Tamayo R. Phase variation of *Clostridium difficile* virulence factors [J]. *Gut Microbes*, 2018, 9: 76.
- [28] Davis J C, Lewis Z T, Krishnan S, *et al.* Growth and morbidity of gambian infants are influenced by maternal milk oligosaccharides and infant gut microbiota [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40466.
- [29] Dion D S, Agus F, Eka L H, *et al.* Effects of probiotic on gut microbiota in children with acute diarrhea; a pilot study [J]. *Paediatr Indones*, 2020, 60: 83.
- [30] Rhoades N, Barr T, Hendrickson S, *et al.* Maturation of the infant rhesus macaque gut microbiome and its role in the development of diarrheal disease [J]. *Genome Biol*, 2019, 20: 173.
- [31] Valeriano V D V, Oh J K, Bagon B B, *et al.* Comparative genomic analysis of *Lactobacillus mucosae* LM1 identifies potential niche-specific genes and pathways for gastrointestinal adaptation [J]. *Genomics*, 2019, 111: 24.
- [32] Han S K, Kim D H. *Lactobacillus mucosae* and *Bifidobacterium longum* synergistically alleviate immobilization Stress-Induced anxiety / depression in mice by suppressing gut dysbiosis [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2019, 29: 1369.
- [33] Liu X, Mao B, Gu J, *et al.* *Blautia*-a new functional genus with potential probiotic properties? [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13: 1.
- [34] Benítez-Páez A, Gómez D, López-Almela I, *et al.* Depletion of *blautia* species in the microbiota of obese children relates to intestinal inflammation and metabolic phenotype worsening [J]. *mSystems*, 2020, 5: e00857.
- [35] Mirjana R, Elena B, Hans G, *et al.* Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141: 1792.

引用本文格式:

中文: 宋佳蓉, 尚可, 雷光伦, 等. 双歧杆菌对慢性腹泻猕猴肠道微生物组的影响[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2022, 59: 066003.

英文: Song J R, Shang K, Lei G L, *et al.* The effects of *Bifidobacterium* on the gut microbiome of macaques with chronic diarrhea [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2022, 59: 066003.