

吴旭颖,陈敏,田玉书,等. 探究不同类型饮水对小鼠生长和粪便菌群的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 88-95.
Wu XY, Chen M, Tian YS, et al. Effects of different types of drinking water on growth and fecal flora of mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 88-95.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.010

探究不同类型饮水对小鼠生长和粪便菌群的影响

吴旭颖,陈 敏,田玉书,李 斌,张文明,刘云波*

(北京华阜康生物科技股份有限公司,北京 102200)

【摘要】 目的 探讨不同类型饮水对小鼠的生长和粪便菌群的影响。**方法** 选取 SPF 级 NIH 小鼠,分成 5 组,每组 32 只,雌雄各半,分别饲喂纯净水(对照组)、酸化水、碱化水、弱酸水和固体水,连续监测 20 d 饮食和体重,实验结束后取动物粪便样本,用细菌 16S rDNA 通用引物扩增 V3-V4 区域,采用 Illumina Miseq 高通量测序平台进行测序,使用生物信息学方法进行微生物群落分析、 α 多样性分析和 β 多样性分析。**结果** 在体重方面,不同 pH 的饮水,雌性小鼠中弱酸水组高于对照组,其他组均低于对照组 ($P>0.05$);雄性小鼠中仅酸化水组的体重高于对照组,其他组均低于对照组,但组间无统计学差异 ($P>0.05$);固体形态水的雌性和雄性小鼠的体重均低于对照组的体重 ($P<0.05$)。在采食和饮水量方面,碱化水组的雌性小鼠饮水和采食量低于其他组,固体水组的饮水量,雌性和雄性小鼠均低于其他组。经 OTU 聚类分析,稀释性曲线说明本次测序的数据量合理。NIH 小鼠粪便菌群共分成五个门,其中拟杆菌门和厚壁菌门占主要地位,属水平上主要是 *Unclassified Porphyromonadaceae*、乳酸杆菌属和另枝菌属。5 种类型饮水的粪便菌群丰度和多样性存在差异, α 分析结果显示,在菌群的丰度和多样性上,酸化水组最高,而在菌群的多样性上,固体水组最低。 β 分析结果显示,固体水组和对照组的粪便菌群最接近,其次分别为碱化水组、酸化水组和弱酸水组。**结论** 通过对不同类型饮水的探索,揭示了固体形态饮水方式对小鼠体重、采食量、饮水量和粪便菌群影响较大,而不同 pH 的饮水影响小鼠的粪便菌群丰度和多样性,尤其是酸化水对小鼠粪便菌群的影响更大。

【关键词】 pH;饮水;高通量测序;粪便菌群

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0088-08

Effects of different types of drinking water on growth and fecal flora of mice

WU Xuying, CHEN Min, TIAN Yushu, LI Bin, ZHANG Wenming, LIU Yunbo*
(Beijing HFK Bioscience Co., Ltd., Beijing 102200, China)

【Abstract】 Objective To explore the effects of different types of drinking water on the growth and fecal flora of mice. **Methods** Specific pathogen-free NIH mice were randomly divided into five groups, 32 mice each group, with half males and half females in each group. The group were given either purified water (control group), acidified water, alkalized water, weakly acidic water or solid water. Diet and body weight were monitored continuously for 20 days. After the experiment, animal fecal samples were collected, and the V3-V4 region was amplified with bacterial 16S rDNA universal primers. An Illumina Miseq high-throughput sequencing platform was used for high-throughput sequencing, and microbial community, α diversity and β diversity were analyzed by bioinformatics method. **Results** The body weight of

female mice given different pH values of weakly acidic water was higher, while the weight of the other groups was lower, than that of the control group ($P>0.05$). The body weight of male mice in the acidified water group was higher, while that of other groups was lower, than that of control group, but there was no statistical difference between the groups ($P>0.05$). The body weights of male and female mice in the solid water group were lower than those in the control group ($P<0.05$). The food and water intake of the female animals in the alkaline water group and the water intake of female animals in the solid water group were lower than those of the other groups. OTU clustering analysis showed that the data volume of the sequencing was reasonable, and the fecal flora species of NIH mice were divided into five phyla, among which *Bacteroides* and *Firmicutes* were dominant. *Unclassified Pseudopurpuromonas*, *Lactobacillus* and *Alistipes* were the main genera. There were differences in fecal flora abundance and diversity among the mice given the five drinking water types. α analysis showed that the acidified water group had the highest flora abundance and diversity, while the solid water group had the lowest flora diversity. β analysis showed that the fecal flora composition in the solid water group was the closest to that of the control group, followed by the alkalized water group, acidified water group and weakly acidic water group. **Conclusions** Through an exploration of the effects of consuming different forms of water, this study revealed that solid water consumption had the greatest effects on body weight, feed intake, water consumption, and fecal flora of mice. The abundance and diversity of fecal flora in mice were affected by different pH values of drinking water, especially acidified water.

[Keywords] pH; drinking water; high-throughput sequencing; fecal flora

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

我国实验动物饮水是参照人的饮用水标准,普通级实验动物饮水应符合国家标准《生活饮用水卫生标准》(GB 5749),清洁级和无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级实验动物饮水要求无菌^[1]。为保障实验动物饮水质量,很多单位普遍采用加酸或碱的方式来控制微生物污染。饮用酸化水是否对实验动物的繁殖性能产生影响有不同的报道^[2],也有研究证实,酸化水可调节动物胃肠道 pH 从而发挥抑菌作用,达到提高生产效益的作用^[3]。在实验动物运输过程中,饮水主要靠添加固体形态的水,但对固体形态水与正常饮水的区别研究较少。本研究对两种类型的饮水做了初步探讨。

随着基因测序、生物信息学等分析工具的广泛使用,对动物肠道微生物的认识和了解越来越多,已有大量文献报道肠道菌群从消化、营养、吸收、能量供应、脂肪代谢、免疫调节、药物代谢和毒性等诸多方面影响宿主的健康状况^[4]。据尹业师等^[5]对影响 ICR 小鼠肠道菌群的六类影响因素的研究报道,饲养环境和饲料是主要影响小鼠肠道菌群变化的因素,而品种、个体和性别等因素的影响较小,年龄因素仅在动物生长发育早期有表现。水也是动物体所需的最基础和重要的营养元素^[6-7],参与机体的新陈代谢、维持水和电解质的平衡、调节机体体温和润滑等多种生理功能^[8-9],据 Bowyer 等^[10]对英国 85 对同卵双胞胎的饮用水、饮水习惯及肠道菌群关系的研究,发现饮用水成分与人体的肠道菌群组成有关,水中的钠离子、氯化物和硫酸盐与肠道

菌群有显著关联。另外,据周坤^[11]和 Dias 等^[12]的报道也证实不同类型饮水可影响小鼠肠道菌的组成。2022 年 Vanhaecke 等^[13]在营养学杂志发表关于 4 种饮用水(瓶装水、自来水、过滤水和井水)及饮水量与粪便肠道菌群的关系,发现井水饮用者 α 多样性最高,瓶装水饮用者较自来水饮用者的毛螺菌科显著增加,饮水量低组比饮水量高组有更高比例的弯曲杆菌属。

综上所述,不同类型饮水可引起机体粪便菌群变化,且饮水的水质也是引起肠道菌群变化的关键因素之一。针对不同形态、pH 饮用水与小鼠粪便菌群的关联研究还很少。因此,本研究在饲养环境和饲料相同的情况下,探究不同类型及 pH 饮水对实验小鼠生长、饮水量、采食量和粪便菌群的影响,为实验动物的饲养、运输以及肠道菌群研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 NIH 小鼠 160 只,体重(11 ± 0.5)g,17~18 日龄,雌雄各半,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供[SCXK(京)2019-0008]。NIH 小鼠均饲养在公司屏障设施内的隔离器[SYXK(京)2019-0022],洁净度为 5 级,温度(23 ± 3)℃,相对湿度($50\%\pm10\%$),换气次数每小时不低于 20 次,明暗照明周期为 12 h/12 h。每笼动物 4 只,自由采食和饮水。饲料为⁶⁰Co 照射的小鼠维持料(京饲证(2019)

06076),营养成分:粗蛋白 20.0%、粗脂肪 4.7%、粗灰分 6.6%、粗纤维 3.8%、水分 8.5%、钙 1.18%、磷 0.92%、赖氨酸 1.02%、蛋氨酸 0.5%、胱氨酸 0.35%。每周更换 1 次垫料,进出隔离器的物品严格消毒。本实验方案按照“3R”原则获得北京华阜康生物科技股份有限公司实验动物福利和伦理委员会批准(HFK-AP-20230118)。

1.1.2 受试水样

(1)纯净水(对照):通过亿佰利 YL-100BU-D(V3)制水机对自来水过滤、净化、反渗透等手段来获得 pH=7.0~7.2,电导率 2.0 $\mu\text{s}/\text{cm}$ 。

(2)酸化水:在纯净水的基础上添加分析纯浓盐酸,调整 pH=2.5~2.7。

(3)碱化水:在纯净水的基础上添加分析纯次氯酸钠,调整 pH=8.5~8.7。

(4)弱酸水:在纯净水的基础上添加分析纯浓盐酸,调整 pH=6.5~6.7。

(5)固体水:在纯净水的基础上添加适量琼脂粉,形成的固态水(每个 60 g),pH=7.1~7.3。

1.2 主要试剂与仪器

分析纯浓盐酸(国药集团化学试剂北京有限公司);分析纯次氯酸钠(西陇科学股份有限公司);营养琼脂(北京陆桥技术股份有限公司);E. Z. N. A™ Mag-Bind Soil DNA Kit(OMEGA, M5635-02);Qubit dsDNA HS 分析试剂盒(ThermoFisher, Q32854);2×Hieff® Robust PCR Master Mix (Yeasten, 10105ES03);Hieff NGS™ DNA Selection Beads (Yeasten, 12601ES56)。亿佰利 YL-100BU-D(V3)制水机;上海卓精千分之一电子天平;Pico-21 Thermo Fisher 台式离心机;GL-88B 漩涡混合器;TND03-H-H 混匀型干式恒温器;DYY-6C 电泳仪电源;DYCZ-21 电泳槽;FR-1000 凝胶成像系统;Q33238 ThermoFisher Qubit® 4.0 荧光计;ETC 811 PCR 仪;Research plus 0.5~10 μL Eppendorf 移液器。

1.3 实验方法

1.3.1 饮水饲喂试验

选取 160 只 17~18 日龄 NIH 小鼠,平均体重(11±0.5)g,随机分为 1 个对照组和 4 个试验组,每组 32 只,雌雄各半。对照组饲喂纯净水,试验组分别饲喂酸化水、碱化水、弱酸水和固体水,饮用 20 d,每天称量动物体重、饲料采食量和饮水量。

1.3.2 粪便样本采集

在生物安全柜内,分别对每组 NIH 小鼠无菌操

作采集粪便样本于无菌 1.5 mL EP 管中,粪便重量为 100~200 mg,采集完后立即将所有的样本冻存于-80℃冰箱内。小鼠粪便样本编号为对照组(C2)、酸化水组(S2)、碱化水组(J2)、弱酸水组(R2)、固体水组(G2)。

1.3.3 粪便样本细菌多样性检测

小鼠粪便样本的 16S rDNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成,具体步骤如下,根据试剂盒说明书,使用 E. Z. N. A™ Mag-Bind Soil DNA Kit 对样本进行基因提取,提取的核酸作为 DNA 模板,并使用 Qubit 4.0(Thermo, USA)测量 DNA 浓度以确保已经提取了足够数量的高质量基因组 DNA。根据细菌 16S rDNA V3-V4 区域设计特异引物序列,第一轮采用通用引物进行 PCR 扩增,反应体系为样本 DNA(10 ng/ μL) 2 μL ,引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 1 μL ,2×Hieff® Robust PCR Master Mix 15 μL ,后补加无菌水到 30 μL ,反应程序为 95℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 20 s,55℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 30 s,反应进行 5 个循环,后 72℃ 延伸 5 min。第二轮扩增,引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物,反应体系为 PCR 产物 20~30 ng,引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 1 μL ,2×Hieff® Robust PCR Master Mix 15 μL ,后补加无菌水到 30 μL ,反应程序为 95℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 20 s,55℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 30 s,反应进行 5 个循环,72℃ 延伸 5 min,10℃ 保存。

1.3.4 高通量测序及生物信息学分析

PCR 产物采用 Illumina Miseq 高通量测序平台进行测序,通过质控过滤去除不符合要求的序列,对所得的 5 组样品进行 OTU 聚类分析、菌群多样性分析、菌群群落结构等分析。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 19.0 软件分析,数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异比较采用 *T* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同类型饮水对小鼠体重影响

在实验开始时,雌性小鼠体重平均为 11.2 g,标准差为 0.2 g,雄性小鼠体重平均为 11.8 g,标准差为 0.19 g,方差分析表明无统计学差异,说明动物分组是均衡的。

由表 1 可见,不同 pH 的饮水,对于雌性小鼠,R2 组高于 C2 组,其他组均低于 C2 组;对于雄性小

鼠,仅 S2 组的体重高于 C2 组,其他组均低于 C2 组,无显著差异($P>0.05$)。不同形态饮水,G2 组的小鼠体重,雌性和雄性小鼠都显著低于 C2 组的体重($P<0.05$)。

2.2 小鼠的饮水量和采食量

由表 2 可见,G2 组雌性和雄性小鼠的饮水量均显著低于其他组($P<0.05$)。J2 组雌性小鼠的饮水和饲料采食量低于其他组。

2.3 不同类型饮水对小鼠粪便菌群的影响

2.3.1 等级丰度曲线

使用 usearch 软件对 reads 在 97.0% 的相似度水平下进行聚类,获得 OTU。5 个样品进行处理共获得 395 519 个有效序列,平均每个样品 65 919 个序列,平均每个样品获得 287 个 OTU,表明样品序列的聚类结果比较可靠,可用于下一步样品序列的注释,并且表明本次实验的测序质量比较高。

为验证样品的测序多样性(丰富和均匀程度)是否达到实验要求,基于样品中的 OTU 序列数,将 OTUs 按丰度由大到小等级排序,再以 OTU 等级为横轴,以每个 OTU 中所含的序列数为纵轴来构建 Rank-Abundance 曲线,物种的丰富程度由曲线在横轴上的长度来反映,曲线越宽,表示物种的组成越丰富;物种组成的均匀程度由曲线的形状来反映,曲线越平坦,表示物种组成的均匀程度越高,结果显示所有样品的曲线都趋于平缓(图 1),说明本次

测序的数据量合理,能够覆盖样本的绝大部分微生物。

2.3.2 稀释曲线

稀释曲线是从样本中随机抽取一定数量的序列,统计这些序列对应样本的 α 多样性指数,以抽取的数据量为横轴,以 α 多样性指数值为纵轴绘制曲线,根据曲线是否达到平缓来判断本次测序数据量是否足够。若曲线急剧上升表明测序量不足,需要增加序列条数;反之,则表明样品序列充分,可以进行数据分析。由图 2 可知,本次样品序列充分,后续数据分析可以进行。

2.3.3 粪便菌群结构分析

从门水平聚类分析,NIH 小鼠粪便菌群主要分为拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、糖化细菌门(*Candidatus saccharibacteria*)、其他(other)五个门,其中拟杆菌门和厚壁菌门占主要地位,除 G2 组,其他 4 组这两门占 90% 以上。变形菌门在 G2 组较其他各组占据较高的比例。

从属水平聚类分析,除未分类的菌属,NIH 小鼠粪便中共分成 19 个属,其中 *Unclassified Porphyromonadaceae* 所占比例最高,其次较多的是乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、另枝菌属(*Alistipes*)、*Unclassified Lachnospiraceae*、巴恩斯氏菌属(*Bamesiella*)、拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)、拟杆

表 1 不同 pH 饮水对小鼠体重的影响($n=16, g$)
Table 1 Effects of drinking water at different pH values on animal body weight

组别 Groups	实验开始 Start of experiment		实验结束 End of experiment	
	♀	♂	♀	♂
对照组 C2	11.31±0.26	11.71±0.36	26.40±1.90	34.27±1.36
酸化水组 S2	11.19±0.25	11.87±0.37	25.82±0.85	34.70±1.60
碱化水组 J2	11.23±0.30	11.93±0.16	25.41±1.41	33.13±1.61
弱酸水组 R2	11.18±0.29	11.80±0.31	26.75±1.21	33.19±1.89
固体水组 G2	11.07±0.28	11.63±0.39	25.01±0.63 ^a	31.93±1.26 ^b

注:雌性小鼠,与对照组相比,^a $P<0.05$;雄性小鼠,与对照组相比,^b $P<0.05$ 。
Note. Female mice, compared with C2, ^a $P<0.05$. Male mice, compared with C2, ^b $P<0.05$.

表 2 小鼠饮水量和采食量($n=16$)
Table 2 Water intake and food intake of mice

组别 Groups	♀		♂	
	饮水量 (mL) Water intake	饲料量 (g) Food intake	饮水量 (mL) Water intake	饲料量 (g) Food intake
对照组 C2	2710±9.12	2805±12.03	3355±10.20	2987±13.45
酸化水组 S2	2690±7.19	2818±11.89	3310±9.34	3032±12.74
碱化水组 J2	2510±8.25 ^a	2719±11.30 ^a	3340±9.41	2981±12.46
弱酸水组 R2	2735±9.01	2791±12.05	3460±10.03	2996±11.09
固体水组 G2	1890±8.75 ^a	2773±11.03	2820±9.02 ^b	2899±11.32

注:雌性小鼠,与对照组相比,^a $P<0.05$;雄性小鼠,与对照组相比,^b $P<0.05$ 。
Note. Female mice, compared with C2, ^a $P<0.05$. Male mice, compared with C2, ^b $P<0.05$.

菌 属 (*Bacteroides*)、 *Unclassified Clostridiales*、 *Saccharibacteria genera incertae sedis*、 *Unclassified Bacteroides*、 *Clostridium XIVa*；而 G2 组的不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 属于优势菌，而其他各组所占比例极低。

2. 3. 4 α 多样性变化分析

α 多样性可以反映微生物群落的丰度和多样性，其中 shannon 与 shannoneven 指数代表着物种的多样性，物种多样性越高，指数越大，反之越小。Ace 和 chao 指数代表着物种丰度，物种丰度越高，ace 和 chao 指数越大。

由表 3 可见，反映样本的物种多样性 shannon 和 shannoneven 值，G2 和 R2 组的多样性数值最小，说明这两组的多样性较其他组低。而代表着物种丰度的 ace 和 chao 值，可见 S2 组的数值最大，说明此组样本丰度最高，C2 组的值最低，丰度也最低。各组样本的 coverage 值均达到了 1. 0，说明样本测序覆盖率较高，实验数据可靠。

2. 3. 5 β 多样性分析

为研究各组粪便样本菌群物种多样性的差异，对数据进行主坐标分析 (principal co-ordinates

analysis, PCoA)，通过 PCoA 可以观察各组间的差异，如果样品距离越接近，表示物种组成结构越相似，群落结构相似度高的样品倾向于聚集在一起，群落差异很大的样品则会远远分开。如图 3 所示，5 组样本可显著区分，其中固体水、碱化水组与对照组最接近，而弱酸水、酸化水组与对照组较远。

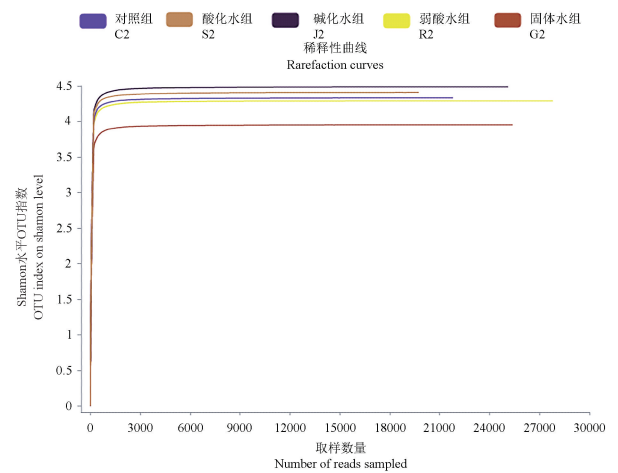


图 2 5 组样本粪便菌群稀释曲线
Figure 2 Fecal flora rarefaction curve of 5 groups of samples

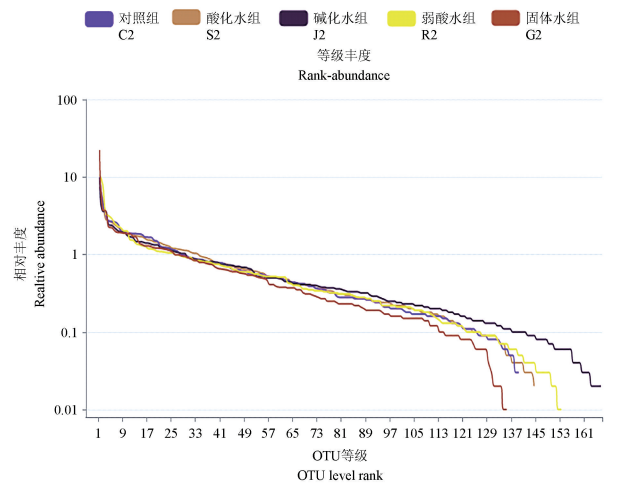


图 1 5 组样本粪便菌群 Rank-Abundance 曲线
Figure 1 Rank-Abundance curve of fecal flora in 5 groups

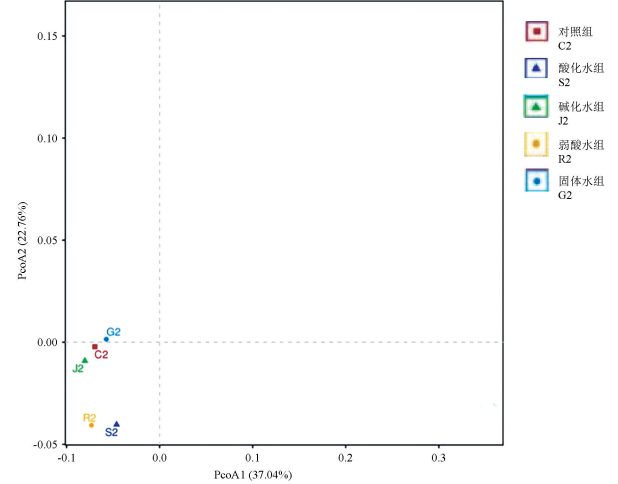


图 3 5 组样本 PCoA 分析图
Figure 3 PCoA analysis of 5 groups of samples

表 3 各组 α 多样性指数统计表
Table 3 α diversity index of each group

组别 Groups	OTU	Shannon	Shannoneven	Ace	Chao	Coverage
对照组 C2	278	4. 05	0. 72	289. 98	293. 33	1. 00
酸化水组 S2	289	4. 07	0. 72	304. 66	305. 92	1. 00
碱化水组 J2	291	4. 11	0. 72	301. 44	302. 55	1. 00
弱酸水组 R2	289	3. 85	0. 68	297. 35	294. 70	1. 00
固体水组 G2	284	3. 42	0. 60	297. 47	298. 29	1. 00

3 讨论

3.1 不同 pH 和形态的饮水探讨

通过对 NIH 小鼠的体重、饮水量和采食量的监测,不同 pH 的饮水,R2 组的雌性小鼠体重高于其他各组,S2 组的雄性小鼠体重也高于其他各组,可能与盐酸刺激胃液的消化有关。从生理上看,动物在消化过程中,主要靠胃蛋白酶,而胃的主细胞产生胃蛋白酶原,胃蛋白酶原需经盐酸激活后才能转化为胃蛋白酶,由胃蛋白酶发挥消化作用,而胃蛋白酶原被激活的最佳酸性环境为 $\text{pH} = 1.5 \sim 2.5$ ^[14],实验所采用的酸化水为 $\text{pH} = 2.5$,可能促进了胃蛋白酶原的激活,从而达到促进消化的作用。J2 组较其他组略低,也可能与胃所需要的酸性消化环境有关,但动物自身通过调节也能满足消化。通过表 1 可见,动物饮水的 pH 对其体重的影响较小,是否会对动物存在其他方面的影响需进一步研究探索。

在饮水形态上,通过表 1 可见,G2 组的小鼠体重显著低于 C2 组,且其饮水量和采食量也低于其他液体形态水组。固体形态水虽然能锁住 99% 的水分,但是与液态形式饮水方式还存在差异,可能与其形态增加动物胃肠饱腹感有关,导致其饮水和采食量较其他组低。另外,也有可能动物自身的不适应性,前期需要一段时间的适应,影响其前期体重的增长,导致其后期体重低于其他组。

3.2 5 种饮水的粪便菌群探讨

3.2.1 粪便菌群的丰度和多样性

粪便菌群变化可反映肠道菌群的状态,本研究通过 Illumina Miseq 高通量测序技术对 5 组饮水类型的 NIH 小鼠粪便菌群的丰度和多样性进行整体分析。结果显示,在菌群的丰度上,S2 组的丰度最高,而在菌群的多样性上,S2 组也较高,G2 组最低。故降低水的 pH 可促进肠道菌群的数量和多样性增加,肠道菌群数量增加的同时也抑制肠道致病菌的繁殖,对维持小鼠肠道健康是有益的。另外,G2 组小鼠粪便菌群的多样性明显较其他组低,此种饮水方式可能影响到小鼠肠道微生物的动态平衡。

3.2.2 在门、属水平探讨粪便优势菌群

小鼠肠道优势菌群以拟杆菌门和厚壁菌门为主,这与文献报道结果一致^[15-16]。从门水平上看,C2 组的拟杆菌门菌群比例最高,其他各组都低于 C2 组,尤其是 G2 组出现显著下降。拟杆菌门是一类能促进碳水化合物发酵,参与糖类、胆汁酸和类

固醇代谢如分解蛋白胨或葡萄糖,产生诸如乙酸、甲酸、乳酸和丙酸等代谢产物的菌群,主要功能在于吸收和降解多糖^[17],保护肠道菌群健康和复杂稳态^[18],通过丙酮酸途径产生乙酸、丙酸来抑制肠道炎症的发生^[19]。厚壁菌门主要包括芽孢杆菌目和乳杆菌目,也是维持动物肠道健康的重要菌群。通过菌群门水平分析可见,G2 组的菌群比例也显著低于其他各组。而变形菌门在 G2 组显著增加,变形菌门是主要引发致病的细菌,主要包括大肠杆菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、幽门螺旋杆菌等,其物种丰度增加,常会引发动物的损伤,以致出现腹泻症状,在实验动物运输过程,经常用固体形态水来补充水分,偶尔会发现个别动物出现腹泻,可能与其肠道菌群的变化有关。

NIH 小鼠粪便菌群在属水平上,菌群以 *Unclassified Porphyromonadaceae*、乳酸杆菌属、另枝菌属、*Unclassified Lachnospiraceae*、巴恩斯氏菌属、拟普雷沃氏菌属等为主。*Unclassified Porphyromonadaceae*,S2 组和 R2 组的比例较 C2 组高,而 G2 组显著低于 C2 组,J2 组与 C2 组无差异。乳酸杆菌属具有改善肠道屏障功能的作用,对肠道菌群结构、肠绒毛结构、上皮细胞通透性和 TJS、粘液的分泌和免疫功能有调节作用^[20],从而达到抵抗致病微生物侵袭并增强肠道屏障功能的作用^[21],通过菌群的分析,可见 S2 组和 R2 组的乳酸杆菌属显著高于 C2 组和 J2 组,而 G2 组低于其他各组。另枝菌属和拟杆菌属,各组饮水都低于 C2 组。*Unclassified Lachnospiraceae*,S2 组和 R2 组显著低于 C2 组,J2 组和 G2 组略高于 C2 组。巴恩斯氏菌属可以抑制肠道中有害菌的生长^[22],但 G2 组显著降低。拟普雷沃氏菌属,J2 组与 C2 组一致,其他各组均显著低于 C2 组。不动杆菌属是主要的条件致病菌,但 G2 组却显著增加。

3.3 动物饮水福利

动物福利要求实验动物享有不受饥渴的权利,要求在实验和饲养过程中为动物提供清洁的饮用水,饮水应确保新鲜、充足,经过净化、灭菌或酸化处理,保证饮水质量^[23],但对饮水的适口性研究较少。通过对 5 种类型饮水的摸索发现,NIH 小鼠偏好弱酸水,其次为纯净水、酸化水和碱化水,而对固体形态水最不喜欢。据李红瑞等^[24]对饮用水的口感及影响因素的研究,发现水中的无机成分和有机成分共同决定水的口感,无机成分中阳离子决定了

主要味调,阴离子发挥协调作用,离子含量处于中低平时口感较好。本实验的小鼠偏好弱酸水,可能与其口感有关,酸化水和碱化水中的离子浓度过高,导致其失去水中原有的味道,且带有刺激性气味,导致动物对其不喜好。

本研究揭示了 5 种饮水类型 NIH 小鼠的生长、粪便菌群的变化,发现提高饮水的酸度能改善小鼠粪便菌群的丰度和多样性,且固体形态的饮水方式对小鼠的体重和肠道菌群均有影响,且会增加致病菌的比例。从饮水口感上看,小鼠更喜好 pH 值偏弱酸和中性的水。本实验仅从饮水的 pH 值和形态上进行了比对,具有一定的局限性,希望能为小鼠生产繁育和科研使用的研究者提供参考依据。

参考文献:

[1] 赵明海, 张潇, 谭德讲, 等. 实验动物饮用水质量控制及处理方式的一些探讨 [J]. 实验动物科学, 2008, 25(1): 58-63.

Zhao MH, Zhang X, Tan DJ, et al. Discussion on quality control and treatment of drinking water for experimental animals [J]. Lab Anim Sci, 2008, 25(1): 58-63.

[2] 陈文文, 余强, 王志远, 等. 不同 pH 值饮用水对 SD 大鼠生长发育及血清生化影响 [J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(1): 61-64, 70.

Chen WW, Yu Q, Wang ZY, et al. Effects of drinking water with different pH values on growth and development and serum biochemistry of SD rats [J]. Lab Anim Comp Med, 2015, 35(1): 61-64, 70.

[3] van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, et al. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy [J]. Avian Pathol, 2006, 35(3): 182-188.

[4] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine [J]. Cell, 2006, 124(4): 837-848.

[5] 尹业师, 王欣. 影响实验小鼠肠道菌群的多因素比较研究 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(4): 12-18.

Yin YS, Wang X. Comparative study for factors that affect microbiota colonization in experimental mice [J]. Lab Anim Sci, 2012, 29(4): 12-18.

[6] Manz F, Wentz A, Sichert-Hellert W. The most essential nutrient: defining the adequate intake of water [J]. J Pediatr, 2002, 141(4): 587-592.

[7] Jéquier E, Constant F. Water as an essential nutrient: the physiological basis of hydration [J]. Eur J Clin Nutr, 2010, 64(2): 115-123.

[8] 马冠生. 水合状态与健康 [A]. 2019 中国浙江宁波达能营养中心第二十二届学术会议 [C]; 2019.

Ma GS. Hydration status and health [A]. The 22nd Academic

Conference of Danone Nutrition Center, Ningbo, Zhejiang, China [C]; 2019.

[9] 马冠生. 水合状态与健康 [J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(4): 337-341.

Ma GS. Hydration status and health [J]. Chin J Prev Med, 2019, 53(4): 337-341.

[10] Bowyer RCE, Schillereff DN, Jackson MA, et al. Associations between UK tap water and gut microbiota composition suggest the gut microbiome as a potential mediator of health differences linked to water quality [J]. Sci Total Environ, 2020, 739: 139697.

[11] 周坤. 连续多代饮用四种饮用水对小鼠肠道菌群影响的研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.

Zhou K. The research of the effects on gut microbiota in mice induced by feeding with four kinds of drinking water in several consecutive generations [D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.

[12] Dias MF, Reis MP, Acurcio LB, et al. Changes in mouse gut bacterial community in response to different types of drinking water [J]. Water Res, 2018, 132: 79-89.

[13] Vanhaecke T, Bretin O, Poirel M, et al. Drinking water source and intake are associated with distinct gut microbiota signatures in US and UK populations [J]. J Nutr, 2022, 152(1): 171-182.

[14] 张廷燕. 胃蛋白酶合剂中稀盐酸的用量 [J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19(5): 318.

Zhang TY. The dosage of dilute hydrochloric acid in pepsin mixture [J]. Chin J Hosp Pharm, 1999, 19(5): 318.

[15] Bezirtoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) [J]. Anaerobe, 2011, 17(6): 478-482.

[16] 曲巍, 张智, 马建章, 等. 高通量测序研究益生菌对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 食品科学, 2017, 38(1): 214-219.

Qu W, Zhang Z, Ma JZ, et al. Effect of probiotics on gut microbiota in mice evaluated by high-throughput sequencing [J]. Food Sci, 2017, 38(1): 214-219.

[17] 杨新宇, 崔嘉, 陈小凤, 等. 应用 Illumina-HiSeq 高通量测序技术分析氨气对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39(5): 948-955.

Yang XY, Cui J, Chen XF, et al. Effects of ammonia on intestinal microbiota diversity of mice analyzed by Illumina-HiSeq high-throughput sequencing technology [J]. Chin J Vet Sci, 2019, 39(5): 948-955.

[18] Zhu S, Ding S, Wang P, et al. Nlrp9b inflammasome restricts rotavirus infection in intestinal epithelial cells [J]. Nature, 2017, 546(7660): 667-670.

[19] Serino M. SCFAs—the thin microbial metabolic line between good and bad [J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(6): 318-319.

[20] Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system [J]. Nature, 2012, 489(7415): 231-241.

[21]

Guilloteau P, Martin L, Eeckhaut V, et al. From the gut to the peripheral tissues; the multiple effects of butyrate [J]. *Nutr Res Rev*, 2010, 23(2): 366-384.

[22]

吕歌, 张智, 杨可心, 等. 高通量测序分析益生菌对冷食小鼠肠道菌群的干预 [J]. *现代食品科技*, 2019, 35(4): 50-55.

Lyu G, Zhang Z, Yang KX, et al. High-throughput sequencing analysis of probiotics intervention in intestinal flora of cold-fed mice [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2019, 35(4): 50-55.

[23]

关宝生, 白雪, 祝丽玲, 等. 影响医学实验动物福利的因素及改善措施 [J]. *黑龙江医药科学*, 2014, 37(4): 86-87.

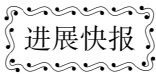
Guan BS, Bai X, Zhu LL, et al. Factors affecting the welfare of medical laboratory animals and improvement measures [J]. *Heilongjiang Med Pharm*, 2014, 37(4): 86-87.

[24]

李红瑞, 袁梓屹, 王昆朋, 等. 饮用水口感及影响因素分析综述 [J]. *给水排水*, 2022, 58(2): 143-151.

Li HR, Yuan ZY, Wang KP, et al. A review of the influence factors on flavor of drinking water [J]. *Water Wastewater Eng*, 2022, 58(2): 143-151.

[收稿日期] 2023-04-14



胰腺导管腺癌类器官模型的建立及个体化治疗策略的筛选

近年来,胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma,PDAC)的发病率明显上升,且PDAC发病隐匿、恶性程度高、化疗反应差异大,导致五年相对生存率低。对癌症患者进行个体化针对性的治疗,可以较大程度改善临床患者预后。类器官(patient-derived organoid,PDO)是由干细胞增殖和分化形成的组织或器官样结构,是近年来新兴的体外3D培养模型。肿瘤PDO模型可以较好地维持原发瘤的组织形态特征。其构建策略是从患者肿瘤组织中提取原代细胞,利用生长因子和基质胶来创建模拟人体内的三维生长环境。类器官能在体外模拟肿瘤细胞的病理状态,与人体临床试验中的药物反应具有更高的相关性,可应用于临床患者的药物筛选,为肿瘤患者的个体化治疗提供了良好的实验平台。此外,通过深度测序或表型分析发现的基因突变和药物治疗靶点,对研究PDAC的发病机制和耐药性具有重要意义。在本研究中,作者重点探索了PDAC类器官模型的培养条件和构建方法,分析了影响类器官模型成功率的主要因素,同时利用病理分析和DNA测序证明了PDAC类器官保持了原发肿瘤组织的生物学特征。进一步选择了四种临床常用的化疗药物进行单一或联合治疗,分析药物在PDO模型中的敏感性,为PDO模型广泛应用于胰腺导管癌患者个体化药物筛选提供思路。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(5): 409-418. <https://doi.org/10.1002/ame2.12352>)。