

导盲犬和淘汰犬肠道菌群的差异性研究^{*}

董建一¹ 许尧² 胡雨奇² 张利龙²
龙尚琴² 李鹏飞² 王靖宇¹ 李明³

(1. 大连医科大学实验动物中心, 大连 116044) (2. 大连医科大学第二临床学院, 大连 116044)

(3. 大连医科大学基础医学院微生物学教研室, 大连 116044)

摘要:目的 探究导盲犬和淘汰犬之间肠道菌群的差异, 分析两者特征性差异菌群。方法 收集16只导盲犬和10只淘汰犬的新鲜粪便样本, 按照犬品种和性别分为拉布拉多雄性导盲犬(GD-ML)和淘汰犬(ED-ML)、拉布拉多雌性导盲犬(GD-FL)和淘汰犬(ED-FL)、金毛雄性导盲犬(GD-MG)和淘汰犬(ED-MG), 另外从中随机抽取9只导盲犬和4只淘汰犬分为导盲犬组(GD)和淘汰犬组(ED), 共分为4组配对。提取粪便样本总DNA, 应用PCR-DGGE技术获得肠道菌群图谱, 应用相关软件和统计学方法对每组配对进行差异性分析。结果 聚类分析结果显示, GD和ED, GD-ML和ED-ML, GD-FL和ED-FL和GD-MG均各归为一类, 表明导盲犬和淘汰犬之间肠道菌群存在差异。肠道菌群多样性、丰富度和均匀度分析结果显示, 每两个配对组之间多样性指数、丰富度指数和均匀度指数存在差异, 但差异均无统计学意义。差异性条带测序分析结果显示: 与ED相比, GD *Megamonas funiformis* YIT 11815菌株增多; 与ED-ML相比, GD-ML *Succinatimonas hippei* YIT 12066、*Lactobacillus vaginalis* DSM 5837、*Lactobacillus acidophilus* NCFM、*Faecalibacterium prausnitzii* A2-165菌株增多, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986和*Prevotella copri* DSM 18205菌株减少; 与ED-FL相比, GD-FL *Ruminococcus gnavus* AGR2154、*Fusobacterium russii* ATCC 25533菌株减少; 与ED-MG相比, GD-MG *Tropheryma whipplei* str. Twist菌株增多。结论 本研究发现导盲犬和淘汰犬肠道菌群存在差异, 未来对差异菌群的进一步研究可能有助于辅助导盲犬的早期筛选。

关键词: 导盲犬; 肠道菌群; PCR-DGGE技术

中图分类号: S852.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0040-08

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.008

导盲犬是辅助视障人士出行的工作犬。我国导盲犬事业与欧美国家相比起步较晚^[1], 导盲犬培训成功率低、成本高、周期长是各国导盲犬培训机构都面临的问题^[2]。导盲犬培训共分为寄养期、培训期、服役期三个阶段, 其中寄养期和培训期是导盲犬的早期筛选阶段^[3], 筛选的主要方式是通过动物行为学测试对犬的行为反应和认知功能进行评判^[4]。但是, 此评估方法具有一定的主观性、局限性和未知性^[1,3], 所以采用客观评估数据辅助犬的早期筛选具有重要意义。肠道菌群是许多哺乳动物重要的

“微生态器官”, 可通过多种途径影响哺乳动物的行为、情绪和认知功能^[5-6]。本研究通过PCR-DGGE技术分析导盲犬和淘汰犬之间的差异性肠道菌群, 进而在动物行为学测试基础上为导盲犬的早期筛选提供一种新的辅助手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 选择身体健康、无消化道疾病及

收稿日期: 2018-12-11

^{*} 基金项目: 大学生创新创业训练计划项目(No.2017101610100129)

作者简介: 董建一与许尧为共同第一作者。

董建一(1979—), 女, 硕士研究生, 实验师, 研究方向: 实验动物学. E-mail: beedream@126.com

许尧(1997—), 男, 本科生, 研究方向: 微生物学. E-mail: 18340810518@163.com

通信作者: 李明(1979—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 微生物学. E-mail: vivianmarat@163.com

王靖宇(1964—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物学. E-mail: wangjingyus@163.com

其他疾病的导盲犬 16 只和淘汰犬 10 只,动物均由中国导盲犬大连培训基地提供,所有导盲犬经中国导盲犬大连培训基地行为学测试并通过,符合《导盲犬》国家标准(GB/T 36186—2018),所有淘汰犬经测试后均不通过,不符合《导盲犬》国家标准。

1.1.2 主要试剂:DNA 提取:E.Z.N.A.® Stool DNA kit 购于美国 Omega 公司;PCR 体系:2×Easytaq PCR SuperMix(+dye)、引物 338F 和 518R 等购于宝生物工程(大连)有限公司;DGGE 体系:尿素、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵、四甲基乙二胺、去离子甲酰胺等均为国产分析纯。

1.1.3 实验分组:随机抽取部分导盲犬(GD,9 只)和淘汰犬(ED,4 只)分为两组,并且将全部导盲犬和淘汰犬按照犬的品种和性别进一步分为拉布拉多雄性导盲犬(GD-ML,7 只)和拉布拉多雄性淘汰犬(ED-ML,6 只),拉布拉多雌性导盲犬(GD-FL,6 只)和拉布拉多雌性淘汰犬(ED-FL,2 只),金毛雄性导盲犬(GD-MG,3 只)和金毛雄性淘汰犬(ED-MG,2 只)。导盲犬和淘汰犬之间进行对比分析,相同品种和性别的导盲犬和淘汰犬之间进行对比分析,共分为 4 组相互平行的配对。

1.2 方法

1.2.1 样本收集和 DNA 提取:收集粪便样本前一个月内,导盲犬和淘汰犬均统一饲食,犬饲食由中国导盲犬大连培训基地提供。分别收集各组犬新鲜粪便 5~10 g,取样后加入粪便 DNA 保护剂,-80 ℃ 保存。对各组犬粪便样本进行 DNA 提取,DNA 提取方法按照 E.Z.N.A.® Stool DNA kit 试剂盒说明书进行。

1.2.2 PCR 扩增:PCR 扩增肠道菌群多样性变化采用 16S rDNA 基因 V3 区特异性序列作为靶标进行 PCR-DGGE 分析。引物序列为:上游引物(338F)和下游引物(518R)。反应体系总体积为 50 μL:内含 25 μL 2×Easytaq PCR SuperMix(+dye),1 μL 518R(10 pmol/μL),1 μL 338F(10 pmol/μL),3 μL DNA 模板,20 μL dddH₂O。反应条件为:93 ℃ 预热,93 ℃ 变性 5 min,93 ℃ 30 s、54.5 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s 进行 30 次循环,72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 10 min。反应完成后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物并保存于-20 ℃ 备用。

1.2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE):(1)配胶:使用 8% 聚丙烯酰胺凝胶,25%~55% 平行变性梯度。25% 变性梯度凝胶由 0.4 mL 50×TAE buffer,2 mL

去离子甲酰胺,4 mL 40% 丙烯酰胺,2.1 g 尿素,11.5 mL ddH₂O 制成;55% 变性梯度凝胶由 0.4 mL 50×TAE buffer,4.4 mL 去离子甲酰胺,4 mL 40% 丙烯酰胺,4.62 g 尿素,6.55 mL ddH₂O 制成。(2)灌胶:灌胶前分别向 25% 低梯度胶和 55% 高梯度胶中加入 80 μL 过硫酸铵,混合均匀,再分别加入 18 μL 四甲基乙二胺,迅速混合,将高、低梯度胶平行匀速推入预先装好的玻璃架中,室温凝固。(3)点样:微量进液器点样。(4)电泳:于 60 ℃ 恒温条件下,200 V 电压下,电泳 10 min。150 V 电压下,电泳约 4 h。(5)染色:溴化乙锭染色 8 min,去离子水漂洗。(6)凝胶成像分析:凝胶成像仪成像,image lab 软件进行数字化处理,并进行分析,切胶后进行回收纯化,再送至大连赛拓生物科技有限公司测序,利用 NCBI 数据库对测序结果进行对比分析。

1.3 统计方法

采用 Quantity One 软件对 DGGE 菌群图谱进行相似性聚类分析及多样性、丰富度和均匀度分析,采用 GraphPad.Prism.v5.0.分析软件进行统计学数据分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用配对 *t* 检验及方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 导盲犬(GD)和淘汰犬(ED)肠道菌群差异

GD 和 ED 粪便菌群 PCR-DGGE 图谱如图 1-1 所示,同一泳道不同条带代表不同的肠道菌群,条带灰度体现了肠道菌群的相对含量。相似性聚类分析结果如图 1-2 所示,1~4 泳道相似度较高,归为一类,5~13 泳道相似度较高,归为一类,表明 GD 和 ED 肠道菌群存在差异。肠道菌群多样性、丰富度和均匀度分析结果如表 1 所示,GD 与 ED 的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数分别为 2.786 ± 0.189 和 2.641 ± 0.445 、 17.800 ± 2.859 和 16.500 ± 6.021 、 0.9720 ± 0.0114 和 0.9738 ± 0.0044 ,且与 ED 相比,GD 多样性指数($t = 0.7579$, $P = 0.4644$)、丰富度指数($t = 0.4770$, $P = 0.6427$)和均匀度指数($t = 0.2868$, $P = 0.7796$)差异均无统计学意义。如图 1 所示,GD 中差异性条带 1 所代表的菌株相对含量高于 ED,条带测序结果(表 2)显示该菌株为 *Megamonas funiformis* YIT 11815,则表明与 ED 相比,GD *Megamonas funiformis* YIT 11815 菌株增多。

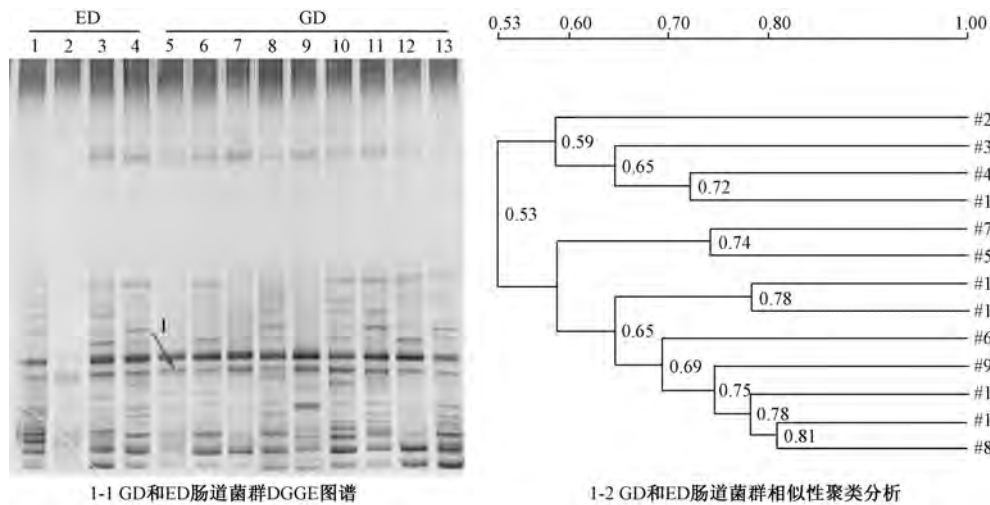


图 1 GD 和 ED 肠道菌群 DGGE 图谱分析和相似性聚类分析
注:同一泳道不同条带代表不同的肠道菌群,条带灰度体现了肠道菌群的相对含量,红色箭头为差异性测序条带

Fig.1 DGGE analysis and similarity cluster analysis of gut microbiota between GD and ED
Note: Different bands in the same lane represent different gut microbiota, the gray scale of the bands reflects the relative content of the gut microbiota, and the red arrow represents the differential sequencing band

表 1 肠道菌群多样性、丰富度和均匀度分析 ($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Analysis of diversity index, richness index and evenness index of gut microbiota ($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	样本数 Number of samples	多样性指数 Diversity index	丰富度指数 Richness index	均匀度指数 Evenness index
ED	4	2. 641±0. 445	16. 500±6. 021	0. 9738±0. 0044
GD	9	2. 786±0. 189	17. 800±2. 859	0. 9720±0. 0114
<i>t</i> 检验		<i>t</i> = 0. 7579	<i>t</i> = 0. 4770	<i>t</i> = 0. 2868
Student's <i>t</i> test		<i>P</i> = 0. 4644	<i>P</i> = 0. 6427	<i>P</i> = 0. 7796
ED-ML	6	3. 277±0. 116	29. 143±3. 270	0. 9737±0. 0016
GD-ML	7	3. 309±0. 186	30. 333±6. 074	0. 9756±0. 0027
<i>t</i> 检验		<i>t</i> = 0. 3553	<i>t</i> = 0. 4124	<i>t</i> = 1. 4540
Student's <i>t</i> test		<i>P</i> = 0. 7291	<i>P</i> = 0. 6880	<i>P</i> = 0. 1738
ED-FL	2	2. 883±0. 145	19. 500±2. 500	0. 9731±0. 0068
GD-FL	6	2. 786±0. 230	18. 000±4. 320	0. 9735±0. 0064
<i>t</i> 检验		<i>t</i> = 0. 4870	<i>t</i> = 0. 4033	<i>t</i> = 0. 0720
Student's <i>t</i> test		<i>P</i> = 0. 6435	<i>P</i> = 0. 7007	<i>P</i> = 0. 9449
ED-MG	2	2. 283±0. 592	12. 500±6. 500	0. 9603±0. 0161
GD-MG	3	2. 637±0. 094	15. 700±1. 886	0. 9617±0. 0125
<i>t</i> 检验		<i>t</i> = 0. 7881	<i>t</i> = 0. 6159	<i>t</i> = 0. 0859
Student's <i>t</i> test		<i>P</i> = 0. 4882	<i>P</i> = 0. 5815	<i>P</i> = 0. 9370

2.2 相同品种及性别的导盲犬和淘汰犬肠道菌群差异

2.2.1 拉布拉多雄性导盲犬 (GD-ML) 和淘汰犬 (ED-ML) 肠道菌群差异分析:GD-ML 和 ED-ML 粪便菌群 PCR-DGGE 图谱如图 2-1 所示。相似性聚类分析结果如图 2-2 所示,1 和 10 泳道相似度较高,11 和 12 泳道相似度较高,均单独归为一类;2-6 泳道相似度较高,归为一类;7~9、13 泳道相似度较

高,归为一类,表明 GD-ML 和 ED-ML 肠道菌群存在差异。肠道菌群多样性、丰富度和均匀度分析结果如表 1 所示,GD-ML 与 ED-ML 的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数分别为 3. 309±0. 186 和 3. 277±0. 116、30. 333±6. 074 和 29. 143±3. 270、0. 9756±0. 0027 和 0. 9737±0. 0016,且与 ED-ML 相比,GD-ML 多样性指数 (*t* = 0. 3553, *P* = 0. 7291)、丰富度指数 (*t* = 0. 4124, *P* = 0. 6880) 和均匀度指数 (*t* =

1. 4540, $P = 0.1738$) 差异均无统计学意义。如图 2-1 所示, GD-ML 中差异性条带 1、2、3 和 6 所代表的肠道菌株相对含量高于 ED-ML, 差异性条带 4 和 5 所代表的肠道菌株相对含量低于 ED-ML, 条带测序结果(表 2) 显示条带 1~6 分别为 *Succinatimonas hippei* YIT 12066、*Lactobacillus acidophilus* NCFM、*Lactobacillus vaginalis* DSM 5837、*Prevotella copri* DSM

18205、*Collinsella aerofaciens* ATCC 25986、*Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 菌株, 则表明相比于 ED-ML, GD-ML *Succinatimonas hippei* YIT 12066、*Lactobacillus vaginalis* DSM 5837、*Lactobacillus acidophilus* NCFM 和 *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 菌株增多, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 和 *Prevotella copri* DSM 18205 菌株减少。

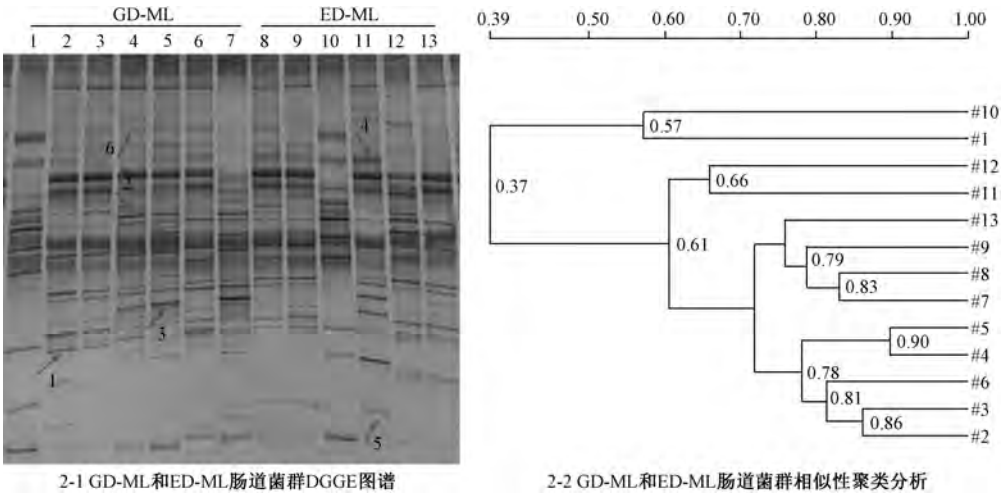


图 2 GD-ML 和 ED-ML 肠道菌群 DGGE 图谱分析和相似性聚类分析
Fig.2 DGGE analysis and similarity cluster analysis of gut microbiota between GD-ML and ED-ML

表 2 DGGE 差异性条带测序分析
Table 2 DGGE differential strip sequencing analysis

组别 Groups	条带编号 Strip number	同源菌株名称 Name of homologous strains	同源性 Identity	门类 Phylum
GD and ED	1	<i>Megamonas funiformis</i> YIT 11815	93%	Firmicutes
	1	<i>Succinatimonas hippei</i> YIT 12066	94%	Proteobacteria
GD-ML and ED-ML	2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	99%	Firmicutes
	3	<i>Lactobacillus vaginalis</i> DSM 5837	100%	Firmicutes
	4	<i>Prevotella copri</i> DSM 18205	98%	Bacteroidetes
	5	<i>Collinsella aerofaciens</i> ATCC 25986	100%	Actinobacteria
GD-FL and ED-FL	6	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> A2-165	99%	Firmicutes
	a	<i>Ruminococcus gnavus</i> AGR2154	92%	Firmicutes
	b	<i>Fusobacterium russii</i> ATCC 25533	90%	Fusobacteria
GD-MG and ED-MG	A	<i>Tropheryma whipplei</i> str. Twist	94%	Actinobacteria

2.2.2 拉布拉多雌性导盲犬 (GD-FL) 和淘汰犬 (ED-FL)、金毛雄性导盲犬 (GD-MG) 和淘汰犬 (ED-MG) 肠道菌群差异分析: GD-FL 和 ED-FL、GD-MG 和 ED-MG 粪便菌群 PCR-DGGE 图谱如图 3-1 所示。相似性聚类分析结果如图 3-2 所示, 12、13 泳道各单独归为一类; 1~6 泳道相似度较高, 归为一类, 7~8 泳道归为一类; 9~11 泳道归为一类, 结果表明 GD-FL 和 ED-FL、GD-MG 和 ED-MG 肠道菌群

存在差异。肠道菌群多样性、丰富度和均匀度分析结果如表 1 所示, GD-FL 和 ED-FL 的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数分别为 2.786 ± 0.230 和 2.883 ± 0.145 、 18.000 ± 4.320 和 19.500 ± 2.500 、 0.9735 ± 0.0064 和 0.9731 ± 0.0068 , 且与 ED-FL 相比, GD-FL 多样性指数 ($t = 0.4870$, $P = 0.6435$)、丰富度指数 ($t = 0.4033$, $P = 0.7007$) 和均匀度指数 ($t = 0.0720$, $P = 0.9449$) 差异均无统计学意义。GD-

MG 和 ED-MG 的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数分别为 2.637 ± 0.094 和 2.283 ± 0.592 、 15.700 ± 1.886 和 12.500 ± 6.500 、 0.9617 ± 0.0125 和 0.9603 ± 0.0161 , 且与 ED-MG 相比, GD-MG 多样性指数 ($t=0.7881, P=0.4882$)、丰富度指数 ($t=0.6159, P=0.5815$) 和均匀度指数 ($t=0.0859, P=0.9370$) 差异均无统计学意义。如图 3-1 所示, GD-FL 中差异性条带 a 和 b 所代表的肠道菌株相对含量低于 ED-

FL, GD-MG 中差异性条带 A 所代表的肠道菌株相对含量高于 ED-MG, 条带测序结果 (表 2) 显示条带 a、b 和 A 分别为 *Ruminococcus gnavus* AGR2154、*Fusobacterium russii* ATCC 25533 和 *Tropheryma whipplei* str. Twist 菌株, 则表明与 ED-FL 相比, GD-FL *Ruminococcus gnavus* AGR2154、*Fusobacterium russii* ATCC 25533 菌株减少; 与 ED-MG 相比, GD-MG *Tropheryma whipplei* str. Twist 菌株增加。

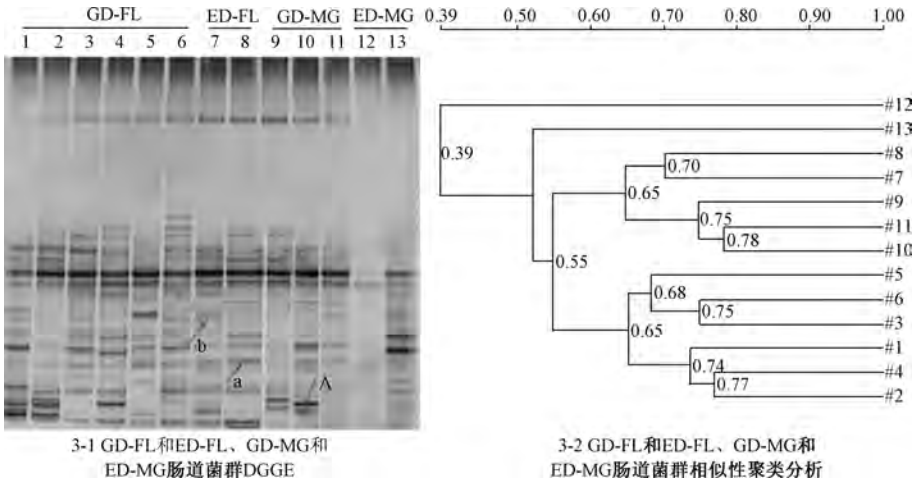


图 3 GD-FL 和 ED-FL、GD-MG 和 ED-MG 肠道菌群 DGGE 图谱分析和相似性聚类分析

Fig.3 DGGE analysis and similarity cluster analysis of gut microbiota between GD-FL and ED-FL, GD-MG and ED-MG

3 讨论

3.1 结果分析

已有研究发现肠道菌群与哺乳动物的行为、情绪和认知功能密切相关,可直接调控其中枢神经系统功能,例如,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 可损害小鼠的学习能力并导致记忆障碍,而约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsonii*) 可减轻 2,4,6-三硝基苯磺酸处理小鼠的结肠炎和记忆障碍症状^[7]; Crumeyrolle-Arias 等研究发现无菌大鼠相比于 SPF (Specific pathogen Free) 大鼠具有更多焦虑样行为^[8]。因此,导盲犬的肠道菌群可能与犬的行为和情绪等气质特征密切相关,有利于辅助导盲犬的早期筛选。

本研究应用 PCR-DGGE 技术分别分析 GD 和 ED 以及相同品种和性别导盲犬和淘汰犬肠道菌群差异。相似性聚类分析结果显示, GD 和 ED 各分为一类 (图 1-2); GD-ML 和 ED-ML 各分为一类 (图 2-2), 1 和 10 泳道相似度较高, 单独归为一类, 但是两者为不同组别, 可能是由于个体差异造成的影响;

GD-FL、ED-FL 和 GD-MG 各归为一类 (图 3-2), 12、13 泳道各单独归为一类, 可能存在个体差异, 7~8 和 9~11 泳道归为同一大类, 但两组为不同犬种, 可能是由于犬品种及性别的不同所造成的影响。肠道菌群多样性、丰富度和均匀度分析结果显示, 每两个配对组之间多样性指数、丰富度指数和均匀度指数差异均无统计学意义。差异性条带测序分析结果显示, 与 ED 相比, GD 中 Firmicutes 门的 *Megamonas funiformis* YIT 11815 菌株增多; 与 ED-ML 相比, GD-ML 中 Proteobacteria 门的 *Succinatimonas hippei* YIT 12066、Firmicutes 门的 *Lactobacillus acidophilus* NCFM、*Lactobacillus vaginalis* DSM 5837 和 *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 菌株增多, Actinobacteria 门的 *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986、Bacteroidetes 门的 *Prevotella copri* DSM 18205 菌株减少; 与 ED-FL 相比, GD-FL 中 Firmicutes 门的 *Ruminococcus gnavus* AGR2154、Fusobacteria 门的 *Fusobacterium russii* ATCC 25533 菌株减少; 与 ED-MG 相比, GD-MG 中 Actinobacteria 门的 *Tropheryma whipplei* str. Twist 菌株增多。

3.2 展望与意义

3.2.1 肠道菌群调节犬行为、情绪和认知功能的可能途径:肠道菌群可通过多种途径影响哺乳动物的行为、情绪和认知功能,脑-肠轴是其中重要的作用途径之一。脑-肠轴是大脑和胃肠道之间紧密连接的双向通路,在调节机体行为反应、认知功能等方面起到了重要作用^[6]。研究发现肠道菌群可调节5-羟色胺(5-HT)^[9]、多巴胺(DA)^[10-11]、 γ -氨基丁酸(GABA)^[12]等多种神经递质的合成和代谢活动,从而参与调控和影响宿主的行为和功能;免疫途径^[13]、短链脂肪酸(SCFAs)代谢途径^[14]等也可能是肠道菌群参与调节的作用途径。

已有研究从神经递质途径、免疫途径、SCFAs代谢途径等脑-肠轴的角度阐述了本导盲犬和淘汰犬之间部分差异菌株的功能和作用。自闭症谱系障碍(Autism spectrum disorder, ASD)是一种以社交和认知功能缺陷为特征的神经疾病,目前认为肠道菌群与脑-肠轴的相互作用是ASD发生发展的一个重要因素^[15],已有研究发现相比于正常儿童,ASD儿童粪便中*Prevotella copri*和*Feacalibacterium prausnitzii*菌属相对丰度减少,且ASD儿童粪便中GABA浓度较低^[16]。有趣的是,本实验结果表明相比于ED-ML, GD-ML中*Prevotella copri*菌属丰度减少而*Feacalibacterium prausnitzii*菌属丰度增多,因此这两种菌属是否可能通过脑-肠轴神经递质途径影响犬的行为、情绪和认知功能有待于进一步研究。*Lactobacillus acidophilus* NCFM菌株是一种益生菌,研究表明该菌可刺激肠上皮细胞系中细胞因子和趋化因子的产生^[17]; *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165菌株对人类和小鼠树突状细胞产生IL-10具有较强的诱导能力,并能够调节T细胞反应^[18];另有研究发现*Ruminococcus gnavus*菌属同样具有对多种免疫因子的调节作用^[19-20],本研究结果表明相比于ED-ML, GD-ML中*Lactobacillus acidophilus* NCFM、*Faecalibacterium prausnitzii* A2-165菌株丰度增多,与ED-FL相比, GD-FL中*Ruminococcus gnavus* AGR2154菌株减少,因此这些差异菌株可能通过脑-肠轴免疫途径产生调节作用。广泛性焦虑症(generalized anxiety disorder, GAD)与GABA、5-HT和去甲肾上腺素(NE)等多种神经递质失调有关^[21],研究发现GAD患者肠道菌群丰富度和多样性显著降低,而*Ruminococcus gnavus*等产SCFAs细菌过度增多,经抗抑郁药物治疗后GAD患者症状有

所改善,但肠道菌群失调并未好转或恢复^[22],本研究结果表明与ED-FL相比, GD-FL中*Ruminococcus gnavus* AGR2154菌株丰度减少,则该菌也可能通过SCFAs代谢途径影响犬的情绪和认知功能。除此之外,与ED相比, GD中*Megamonas funiformis* YIT 11815菌株增多,与ED-ML相比, GD-ML中*Succinatimonas hippei* YIT 12066和*Lactobacillus vaginalis* DSM 5837菌株增多, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986菌株减少;与ED-FL相比, GD-FL中*Fusobacterium russii* ATCC 25533菌株减少;与ED-MG相比, GD-MG中Actinobacteria门的*Tropheryma whipplei* str. Twist菌株增多,目前还没有相应的研究阐明上述差异菌群在脑-肠轴方面的功能和作用。肠道菌群与脑-肠轴存在广泛而深刻的联系,因此,研究导盲犬的特征性优势菌群与神经递质和其他代谢产物之间的联系有助于探索肠道菌群的可能作用机制。

3.2.2 肠道菌群调节幼犬的气质类型:广泛的实验研究和临床实践证明益生菌和益生元治疗在改善哺乳动物焦虑、抑郁等异常行为和情绪方面具有明显的积极作用^[23-24],例如, Gareau等发现服用乳酸菌能够明显改善由母子分离刺激导致的大鼠应激反应^[25]。因此,益生菌和益生元用于幼犬的早期发育阶段可能改善其肠道菌群结构和组成,促使幼犬的气质类型朝向有利于导盲犬筛选的预期方向发展。

3.3 不足之处

本研究首次就导盲犬和淘汰犬肠道菌群的差异进行分析和研究,但仍存在以下几点不足之处:①目前尚未阐明两者差异菌群的具体功能以及作用机制和途径,仍有待于后续实验的进一步研究;②由于部分组别犬数量有限,实验结果无疑会受到个体差异的影响;③本实验中应用的PCR-DGGE技术只能作定性分析,存在一定的主观性和局限性,而肠道菌群的高通量测序技术是目前用于肠道微生物研究最前沿、最常见的检测技术^[26],利用高通量测序技术有助于发现丰度较低的微生物或未知微生物,可全面、准确地获取肠道菌群的定量化信息^[27];④肠源细菌物质可能是调节脑-肠轴的关键,以代谢组学结合高通量测序技术探索可能机制是更好的选择。

综上所述,本研究发现导盲犬和淘汰犬肠道菌群存在差异,有文献表明两者特征性的差异菌群可通过脑-肠轴影响宿主的行为、情绪和认知功能。但限于当前研究水平,本研究尚未对两者差异菌群的

功能及作用途径展开深入研究。值得肯定的是,对肠道菌群的深入分析可能会成为导盲犬早期筛选的有效补充手段,有助于缩短培训周期,节约培训成本。

参考文献

- [1] 李慧玲,王亮,董建一,等.动物行为学应用——导盲犬的培训与应用情况简介[J].实验动物科学,2010,27(4):81-82.
- [2] 王福金,王爱国,王亮,等.偏侧性测试在预测成功导盲犬中的应用[J].实验动物科学,2012,29(3):57-60.
- [3] 袁野,唐芳索.导盲犬的选择及其训练方法[J].中国工作犬业,2008,(11):23-25.
- [4] 王爱国,王福金,王亮,等.气质测试在导盲犬培育中的应用[J].畜牧与兽医,2012,44(2):45-47.
- [5] Yano J M, Yu K, Donaldson G P, *et al.* Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis[J]. Cell,2015,161(2):264-276.
- [6] Carabotti M, Scirocco A, Maselli M A, *et al.* The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems [J]. Annals of Gastroenterology Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology, 2015, 28(2):203-209.
- [7] Jang S E, Lim S M, Jeong J J, *et al.* Gastrointestinal inflammation by gut microbiota disturbance induces memory impairment in mice [J]. Mucosal Immunology, 2017, 11(2):369-379.
- [8] Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, *et al.* Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats [J]. Psychoneuroendocrinology, 2014, 42(2):207-217.
- [9] Golubeva A V, Joyce S A, Moloney G, *et al.* Microbiota-related Changes in Bile Acid & Tryptophan Metabolism are Associated with Gastrointestinal Dysfunction in a Mouse Model of Autism [J]. Ebiomedicine, 2017, 24(C):166-178.
- [10] 范文涛,闫咏梅,别玉龙,等.大鼠卒中后肠道菌群紊乱与抑郁的关系[J].中国脑血管病杂志,2016,13(12):644-649.
- [11] 杨絮,唐岚,单伟光.三生合欢饮抗抑郁作用及其对肠道菌群影响的实验研究[J].浙江中西医结合杂志,2017,27(7):554-557.
- [12] Lyte M. Microbial Endocrinology in the Microbiome-Gut-Brain Axis: How Bacterial Production and Utilization of Neurochemicals Influence Behavior [J]. Plos Pathogens, 2013, 9(11):e1003726.
- [13] Dantzer R, Konsman J P, Bluthé R M, *et al.* Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? [J]. Autonomic Neuroscience Basic & Clinical, 2000, 85(1):60-65.
- [14] Schroeder F A, Lin C L, Crusio W E, *et al.* Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse[J]. Biological Psychiatry, 2007, 62(1):55-64.
- [15] Li Q, Zhou J M. The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder[J]. Neuroscience, 2016,(324):131-139.
- [16] Kang D W, Ilhan Z E, Isern N G, *et al.* Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders[J]. Anaerobe, 2017, 49:121-131.
- [17] Jiang Y, Lü X, Man C, *et al.* Lactobacillus acidophilus induces cytokine and chemokine production via NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in intestinal epithelial cells [J]. Clinical & Vaccine Immunology, 2012, 19(4):603-608.
- [18] Rossi O, Berkel L A V, Chain F, *et al.* Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses [J]. Scientific Reports, 2016, 6:18507.
- [19] Sundin J, Rangel I, Repsilber D, *et al.* Cytokine Response after Stimulation with Key Commensal Bacteria Differ in Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome (PI-IBS) Patients Compared to Healthy Controls[J]. Plos One, 2015, 10(9):e0134836.
- [20] Chang S E, Mishima Y, Bo L, *et al.* 315 Induction of Bacterial Antigen-Specific Colitis by a Simplified Human Microbiota Consortium in Gnotobiotic IL-10-/-Mice [J]. Infection & Immunity, 2014, 144(5):2239-2246.
- [21] Ballenger J C. Overview of different pharmacotherapies for attaining remission in generalized anxiety disorder [J]. J Clin Psychiatry, 2001, 62 (Suppl 19):11-19.
- [22] Jiang H Y, Zhang X, Yu Z H, *et al.* Altered gut microbiota profile in patients with generalized anxiety disorder [J]. Journal of Psychiatric Research, 2018, 104:130-136.
- [23] Aitbelgnaoui A, Colom A, Braniste V, *et al.* Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice [J]. Neurogastroenterology & Motility, 2014, 26(4):510-520.
- [24] Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, *et al.* Effects of the probiotic Bifidobacterium infantis in the maternal separation model of depression [J]. Neuroscience, 2010, 170(4):1179-1188.
- [25] Gareau M G, Jury J, MacQueen G, *et al.* Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation [J]. Gut, 2007, 56(11):1522-1528.
- [26] Qin N, Li D, Yang R. Next-generation sequencing technologies and the application in microbiology-a review [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(4):445-457.
- [27] 郑艺,张家超,郭壮,等.基于高通量测序技术分析肠道菌群及其影响因素的研究进展[J].中国食品报,2014,14(11):157-164.

Analysis of the Differences of Gut Microbiota between Guide Dogs and Eliminated Dogs

DONG Jianyi¹, XU Yao², HU Yuqi², ZHANG Lilong², LONG Shangqin²,
LI Pengfei², WANG Jingyu¹, LI Ming³

(1.Laboratory Animal Center of Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

(2.The Second Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

(3.College of Basic Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract: Objective To explore the differences of gut microbiota between Guide Dogs and Eliminated Dogs, and analyze the characteristic differential gut microbiota of two groups. **Method** Fresh feces from 16 Guide Dogs and 10 Eliminated Dogs were collected. On the one hand, according to dogs' breed and gender, dogs were divided into Male Labrador retriever Guide Dog (GD-ML) and Eliminated Dog (ED-ML), Female Labrador retriever Guide Dog (GD-FL) and Eliminated Dog (ED-FL), Male Golden retriever Guide Dog (GD-MG) and Eliminated Dog (ED-MG). Nine Guide Dogs and 4 Eliminated Dogs randomly selected from all dogs were divided into Guide Dog (GD) and Eliminated Dog (ED). All dogs were totally divided into 4 matching groups. The genomic DNA was extracted from the fresh feces. The fingerprints of the gut microbiota were obtained by PCR-DGGE. The differences were analyzed by relevant software and statistical method. **Result** The result of cluster analysis showed that GD and ED, GD-ML and ED-ML, GD-FL, ED-FL and GD-MG were all classified into one class, indicating that there were differences of gut microbiota between Guide Dogs and Eliminated Dogs. There were also differences in diversity index, richness index and evenness index between each two paired groups, but the differences were not statistically significant. The result of differential strip sequencing analysis showed that compared with ED, *Megamonas funiformis* YIT 11815 were increased in GD; compared with ED-ML, *Succinatimonas hippei* YIT 12066, *Lactobacillus vaginalis* DSM 5837, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 were increased and *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986, *Prevotella copri* DSM 18205 were decreased in GD-ML; compared with ED-FL, *Ruminococcus gnavus* AGR2154, *Fusobacterium russii* ATCC 25533 were decreased in GD-FL; compared with ED-MG, *Tropheryma whipplei* str. Twist were increased in GD-MG. **Conclusion** This study found that there were differences of gut microbiota between Guide Dogs and Eliminated Dogs. Further research on differential microbiota in the future may help to assist early screening of Guide Dogs.

Key words: Guide Dog; gut microbiota; PCR-DGGE technology