

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2026.03.006
文章编号: 1005-8982 (2026) 03-0032-12

实验研究·论著

联合抗生素对伪无菌模型大鼠的肠道菌群及其代谢的影响*

贺莉¹, 颜家朝², 喻京生²

(1. 湖南中医药大学第一临床学院, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院眼科, 湖南长沙 410007)

摘要: **目的** 比较联合抗生素灌胃与自由饮水两种给药复制大鼠伪无菌模型的效果, 为优化伪无菌模型复制方法提供参考。 **方法** 将SD大鼠随机分为正常组、抗生素灌胃组和抗生素饮水组, 每组5只。抗生素灌胃组采用含200 mg/mL氨苄西林、200 mg/mL甲硝唑、200 mg/mL新霉素和100 mg/mL万古霉素的混悬液, 按1 mL/kg体积每日灌胃; 抗生素饮水组在灭菌饮用水中加入0.5 g/L氨苄西林、0.5 g/L甲硝唑、0.5 g/L新霉素和0.25 g/L万古霉素, 大鼠自由饮水, 干预14 d。干预后第5、10、14天, 无菌取大鼠粪便进行菌群培养; 14 d后取大鼠粪便进行16S核糖体rDNA(16S rDNA)测序; 分离肝脏、脾脏、肾脏、胸腺称重, 取各组大鼠结肠组织进行苏木精-伊红(HE)染色及免疫组织化学染色。 **结果** 与正常组比较, 在有氧和厌氧培养条件下, 第5天起抗生素灌胃组和抗生素饮水组粪便菌落显著减少, 伪无菌大鼠模型复制成功并稳定维持到第14天。与正常组比较, 抗生素饮水组第2~6天体重均下降($P < 0.05$), 第7~14天体重差异均无统计学意义($P > 0.05$); 抗生素灌胃组第6天体重高于正常组($P < 0.05$)。正常组、抗生素灌胃组和抗生素饮水组大鼠肝脏、肾脏、脾脏和胸腺系数的比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠结肠免疫组织化学结果显示, 与正常组比较, 抗生素灌胃组与抗生素饮水组中紧密连接蛋白闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)在肠上皮和腺上皮细胞胞质及细胞膜呈阳性表达, 棕黄色染色较多。基于16S rDNA测序的 α 多样性分析显示: 与正常组比较, 抗生素灌胃组和抗生素饮水组的ACE、Sobs及Shannon指数均降低($P < 0.05$), Simpson指数均升高($P < 0.05$); 抗生素饮水组的Simpson指数较抗生素灌胃组升高($P < 0.05$)。基于Bray-Curtis距离的 β 多样性分析显示: 正常组样本与抗生素灌胃组、抗生素饮水组样本明显分离(ANOSIM相似性分析: $r = 0.816, P = 0.001$)。抗生素灌胃组和抗生素饮水组变形菌门丰度均高于正常组(均 $P < 0.05$), 抗生素灌胃组与抗生素饮水组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 正常组厚壁菌门、拟杆菌门及放线菌门丰度高于抗生素灌胃组和抗生素饮水组(均 $P < 0.05$)。抗生素饮水组摩根菌属丰度高于抗生素灌胃组和正常组(均 $P < 0.05$); 抗生素灌胃组埃希-志贺菌属丰度高于抗生素饮水组和正常组($P < 0.05$); 正常组乳酸杆菌属、拟杆菌属及norank_f_Muribaculaceae属丰度高于抗生素灌胃组和抗生素饮水组(均 $P < 0.05$)。基于KEGG的菌群功能预测分析结果显示: 在碳水化合物代谢、氨基酸代谢、能量代谢、萜类化合物和聚酮类化合物代谢、辅助因子和维生素代谢等多个途径上, 3组预测丰度的总体比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。 **结论** 联合抗生素灌胃和自由饮水给药均可在14 d内有效复制SD大鼠伪无菌模型, 但抗生素灌胃组与抗生素饮水组均出现条件致病菌异常繁殖现象, 这提示抗生素干预可能通过筛选压力改变菌群结构, 使原本处于低丰度的潜在致病菌获得生长优势。这为研究者根据实验目标菌群选择适宜的抗生素给药策略复制伪无菌模型提供了参考。

关键词: 16S rDNA测序; 伪无菌大鼠; 肠道屏障; 闭锁小带蛋白-1; 闭合蛋白; 抗生素联合使用

中图分类号: R-332

文献标识码: A

The effect of combined antibiotics on the intestinal flora and its metabolism in the construction of a pseudo germ-free rat model*

收稿日期: 2025-05-23

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No: 8227150650); 湖南省自然科学基金面上项目(No: 2022JJ30460)

[通信作者] 喻京生, E-mail: yujingsheng-mike@163.com

He Li¹, Yan Jia-chao², Yu Jing-sheng²

(1. The First Clinical College of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

Abstract: Objective To compare the effects of combined antibiotics administered via gavage and free drinking water to establish a pseudo germ-free (PGF) model in SD rats, and to provide a reference for the optimisation of the construction method of the PGF model. **Methods** SD rats were randomly divided into 3 groups of 5 rats each: normal group (Group N), antibiotic gavage group (Group I) and antibiotic drinking water group (Group D). Group I was treated with a suspension containing 200 mg/mL ampicillin, 200 mg/mL metronidazole, 200 mg/mL neomycin, and 100 mg/mL vancomycin by daily gavage at a rate of 1 mL/kg volume; In group D, 0.5 g/L ampicillin, 0.5 g/L metronidazole, 0.5 g/L neomycin and 0.25 g/L vancomycin were added to sterilised drinking water and rats were given free access to water for 14 d of the intervention. On the 5th, 10th and 14th days after the intervention, feces of the rats were aseptically taken for bacterial colony culture; after 14 days, rat faeces were taken for 16S ribosomal rDNA (16S rDNA) sequencing; liver, spleen, kidney and thymus were isolated and weighed, and colon tissue was taken for HE and immunohistochemical staining. **Results** Compared with group N, under aerobic and anaerobic culture conditions, the fecal colonies in groups I and D significantly decreased from day 5. The PGF rat model was established and stably maintained until day 14. However, compared with group N, the body weight of group D significantly decreased from day 2 to day 6 (both $P < 0.05$), and the difference in weight from day 7 to 14 was not statistically significant ($P > 0.05$); the weight of the group I was higher than that of the group N on day 6 ($P < 0.05$). Comparison of liver, kidney, spleen and thymus coefficients of rats in group N, group I and group D showed no statistically significant difference ($P > 0.05$). Alpha diversity analysis based on 16S rDNA sequencing showed that ACE, Sobs and Shannon indices were decreased ($P < 0.05$) and Simpson indices were increased ($P < 0.05$) in the group I and group D compared with the group N; Simpson indices in the group D were increased ($P < 0.05$) compared with that in the group I. Beta diversity analysis based on Bray-Curtis distance showed that the samples from the normal group were significantly separated from the samples from the group I and group D (ANOSIM similarity analysis: $r = 0.816$, $P = 0.001$); Samples from the group I and group D were clustered closer together, indicating a higher degree of similarity in bacterial flora composition between the two groups. The abundance of Proteobacteria was higher in the group I and group D than in the group N (both $P < 0.05$), and the difference between the group I and group D was not statistically significant ($P > 0.05$); the abundance of Firmicutes, Bacteroidetes and Actinomycetes was higher in the normal group than in the group I and group D (all $P < 0.05$). The abundance of Morganella spp. was higher in the group D than in the group I and the group N (both $P < 0.05$); the abundance of Escherichia-Shigella spp. was higher in the group I than in the group D and the group N (both $P < 0.05$); the abundance of Lactobacillus spp., Bacteroides spp. and norank_f_Muribaculaceae spp. in the group N was higher than in the group I and group D (both $P < 0.05$). KEGG-based functional prediction analyses of the bacterial colonies showed statistically significant differences ($P < 0.05$) in the overall comparison of predicted abundance among the three groups in a number of pathways, including carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, energy metabolism, terpene and polyketide metabolism, cofactors, and vitamin metabolism. **Conclusion** Combined antibiotics administered by gavage and free drinking water were effective in replicating the PGF rat in SD rats within 14 d. However, abnormal multiplication of conditionally pathogenic bacteria occurred in both the group I and the group D, which suggests that antibiotic interventions may change the colony structure through screening pressure, so that potentially pathogenic bacteria, which would otherwise be at a low abundance, may gain a growth advantage. This provides a reference for researchers to replicate the PGF rat model by selecting appropriate antibiotic administration strategies according to the experimental target flora.

Keywords: 16S rDNA sequencing; pseudo germ-free rats; intestinal barrier; ZO-1; Occludin; antibiotic combination

肠道菌群作为宿主重要的“代谢器官”,在营养吸收、免疫调节和疾病防御等方面发挥关键作用^[1-2]。肠道菌群失调与多种疾病的发生、发展密切相关,如炎症性肠道疾病、血管内皮损伤、神经认知

恢复,以及肥胖和糖尿病等代谢性疾病^[3-6]。因此,深入研究肠道菌群与宿主健康的互作机制具有重要的科学意义和临床价值。

伪无菌动物模型,特别是伪无菌大鼠模型,是研究肠道菌群在生理和病理过程中作用的理想工具^[7-9]。相较于无菌模型,伪无菌模型有类似于无菌动物的特性^[10-11],且更接近真实的动物生理功能。伪无菌动物模型在维持肠道黏膜结构完整性和免疫功能方面优于完全无菌模型,因此近年来,伪无菌模型而不是无菌模型被频繁用于研究肠道菌群与外源代谢之间的关系^[12-13]。这其中,伪无菌大鼠肠道屏障功能也得到越来越多的关注。然而,目前仍缺乏对伪无菌模型与正常肠道状态在肠道微生物结构、肠道屏障功能及系统代谢特征方面的系统比较研究。目前,氨苄西林钠、硫酸新霉素、甲硝唑和盐酸万古霉素是复制伪无菌模型常用的抗生素组合,但伪无菌模型复制方法和时间缺乏统一性和标准化^[14-15]。此外,长期使用广谱抗生素可能导致菌群失调、耐药性产生,以及对宿主生理功能的非特异性影响^[16]。因此,短期、稳定且可靠的伪无菌大鼠模型有助于更准确地揭示特定菌群或菌群结构变化对宿主的影响,为开发基于菌群的疾病干预策略奠定基础。

本研究通过联合抗生素灌胃与饮水两种方法复制伪无菌大鼠模型,探究不同方法复制的伪无菌模型大鼠的生物学特性、肠道屏障及代谢功能,拟建立一种规范稳定、高效且无病理损伤的伪无菌大鼠模型复制方法,为肠道菌群相关研究提供可行的模型复制策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 采用6~8周龄SD大鼠15只,均为SPF级雄性健康大鼠,体重150~180 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司(实验动物生产许可证号:SCXK湘2021-0002,实验动物使用许可证号:SYXK湘2019-0009)。大鼠饲养条件:12/12 h光/暗循环,温度(23±2)℃,相对湿度55%,动物自由摄食饮水,适应性喂养7 d。本动物实验方案经湖南中医药大学动物伦理委员会批准,实验动物伦理批准号:HNUCM21-2311-11。

1.1.2 主要试剂和仪器 5%无菌脱纤维马血(南京森贝伽生物科技有限公司,货号:SBJ-ST-HO005),营养肉汤培养基粉(货号:HB0108)、营养琼脂粉(货号:HB0129)、EG培养基(货号:HB8594)(青岛海博生物技术有限公司),甲硝唑(货号:O16IS228855)、氨苄西林(货号:JS274127)、新霉素(货号:KS361817)和万古霉素(货号:JY247625)(上海源叶生物科技有限公司),微生物350 mL厌氧培养袋和厌氧产气袋购于日本三菱集团,PBS液(北京索莱宝科技有限公司,批号:240008004),戊巴比妥钠(德国Merck KgaA公司,批号:2209116),苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号:G1005),兔多克隆抗体闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号:GB11195),兔多克隆抗体闭合蛋白(Occludin)(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:27260-1)。脱水机(型号:JJ-12J)、包埋机(型号:JB-P5)(武汉俊杰电子有限公司),病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016)。

1.1.3 联合抗生素配置方案 参考文献^[17-19],确定抗生素灌胃组灌胃^[20-22]和抗生素饮水组饮水^[15,23]方法和剂量。抗生素灌胃组:200 mg/mL氨苄西林、200 mg/mL甲硝唑、200 mg/mL新霉素和100 mg/mL万古霉素的混悬液,按1 mL/kg体积灌胃。抗生素饮水组:在灭菌饮用水中加入0.5 g/L氨苄西林、0.5 g/L甲硝唑、0.5 g/L新霉素和0.25 g/L万古霉素配成混悬液,大鼠自由饮水。

1.2 实验方法

1.2.1 分组及模型复制 将SD大鼠随机分为正常组、抗生素灌胃组、抗生素饮水组,各5只。抗生素饮水组饮水仅限于抗生素水,每2天更换新鲜抗生素饮水,自由摄取食物;抗生素灌胃组每天给予联合抗生素灌胃,正常饮水和饲料喂养;正常组以生理盐水灌胃,正常饮水和饲料喂养。共喂养14 d。

1.2.2 培养基制备 EG培养基:根据说明书配成,灭菌冷却后加5%无菌脱纤维马血备用;营养肉汤培养基:根据说明书配成,灭菌冷却后备用。

1.2.3 观察大鼠日常行为 观察大鼠的进食、饮水、毛发光泽、精神状态和粪便等日常情况,持续14 d。

1.2.4 大鼠体重和脏器系数检测 持续14 d记录大鼠的体重。大鼠安乐死后,分离脾脏、肾脏、肝脏

和胸腺,记录克重并计算脏器系数。脏器系数=脏器质量/(体重/100)×100%。

1.2.5 大鼠粪便菌群培养 无菌收集大鼠粪便。取1 g样本于9 mL含有2粒6 mm无菌玻璃珠的PBS中,充分振荡使样本均质化,随后按 1×10^{-1} 对样本进行梯度稀释。吸取100 μ L涂布于培养皿,静置30 min。厌氧培养时将厌氧产气袋与培养皿密封于厌氧袋^[23],有氧培养直接倒置入培养箱,均于37 $^{\circ}$ C培养24~48 h后拍照记录菌落数。

1.2.6 HE染色观察结肠组织 采用戊巴比妥钠处死大鼠,取结肠组织放入多聚甲醛固定,经脱水、透明、浸蜡及石蜡包埋,切成4 μ m切片。将切片依次置于二甲苯I中浸泡20 min、二甲苯II中浸泡20 min、无水乙醇I中浸泡5 min、无水乙醇II中浸泡5 min、75%乙醇中浸泡5 min进行梯度脱水,随后用流水冲洗。加入苏木精染液中染色3~5 min,水洗,分化液分化,水洗,返蓝液返蓝,冲洗;切片依次置于85%、95%梯度乙醇脱水各5 min,加入伊红染液中染色5 min。将已完成染色的切片依次置于无水乙醇I、无水乙醇II、无水乙醇III中各浸泡5 min进行彻底脱水;随后,将切片移入二甲苯I和二甲苯II中各透明5 min,中性树胶封片。最后,使用光学显微镜对切片进行观察和图像采集分析。

1.2.7 免疫组织化学染色检测结肠组织紧密连接蛋白ZO-1、Occludin的表达 组织切片脱蜡水化后浸于枸橼酸钠溶液,微波炉高温抗原修复至表面有气泡,自然冷却至室温。经3% H_2O_2 内源性封闭、5%BSA外源性封闭后,滴加稀释抗体(ZO-1 1:100, Occludin 1:100)4 $^{\circ}$ C过夜,二抗孵育1 h,暗室显微镜观察显色,染核脱水透明封片后观察表达。采用Image J软件对其进行分析。

1.2.8 16S核糖体rDNA(16S Ribosomal DNA, 16S rDNA)测序 提取大鼠粪便样本微生物总DNA,用肠道菌群V3-V4区引物338F(5'-ACTCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行PCR扩增。产物纯化合格后上机测序,数据过滤后构建扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV),进行物种分类注释、丰富度、多样性及差异分析,使用预测工具Tax4Fun(R-3.3.1版)进行功能预测。本次测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成,生物信息学分析用美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com/>)。

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 27.0、Origin 2022及R语言统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析或H检验,两两比较用LSD-t检验、Dunn's test或 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组大鼠日常行为

空白组大鼠精神状态良好,饮食饮水正常,较活跃,粪便成形;抗生素灌胃组和抗生素饮水组大鼠精神差,毛发粗糙、光泽度降低,实验前5 d饮水减少、后期饮水多,粪便偏软。

2.2 3组大鼠体重及脏器系数比较

正常组、抗生素灌胃组和抗生素饮水组大鼠第2~14天的体重比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的体重比较,差异有统计学意义($F=397.823, P=0.000$);②3组的体重比较,差异有统计学意义($F=12.797, P=0.001$);③3组体重的变化趋势比较,差异有统计学意义($F=5.974, P=0.000$)。进一步两两比较,采用LSD-t检验,结果:与正常组相比,抗生素饮水组第2~6天体重均下降($P < 0.05$),第7~14天体重差异均无统计学意义($P > 0.05$);抗生素灌胃组第6天体重高于正常组($P < 0.05$)。见表1。

正常组、抗生素灌胃组和抗生素饮水组大鼠肝脏、肾脏、脾脏和胸腺系数的比较,经单因素方差分析,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

2.3 大鼠粪便菌群体外培养结果

大鼠粪便菌群体外有氧和厌氧培养显示,正常组粪便培养皿表面的菌落多;而从第5天至第14天,抗生素灌胃组和抗生素饮水组菌落极少,偶散见菌落成形(见图1)。与正常组相比,两种模型复制方法均能在第5天即可将肠道菌群大部分清除,短期内复制伪无菌模型成功且稳定。

2.4 各组大鼠结肠组织病理学比较

正常组大鼠结肠上皮细胞结构清晰、隐窝完整、固有层无水肿;抗生素灌胃组及抗生素饮水组大鼠结肠组织结构完整,杯状细胞增多、帕内特细胞减少,炎症细胞浸润轻、隐窝完整。与正常组相比,两种伪无菌模型复制方法均未对大鼠结肠组织

表 1 3组大鼠不同时间的体重比较 (n=5, g, $\bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天
正常组	258.20 ± 8.32	268.80 ± 9.73	283.60 ± 10.90	291.20 ± 10.35	297.60 ± 9.42	308.00 ± 7.18	320.20 ± 10.40
抗生素灌胃组	266.60 ± 10.57	271.60 ± 10.26	279.20 ± 6.98	290.00 ± 4.58	298.20 ± 5.12	319.60 ± 12.36	333.20 ± 14.48
抗生素饮水组	264.40 ± 8.08	242.20 ± 1.64	245.40 ± 3.21	250.80 ± 2.17	267.2 ± 15.71	283.20 ± 12.68	288.80 ± 7.69
F 值	1.241	23.181	12.191	5.469	4.035	4.639	0.610
P 值	0.324	0.000	0.001	0.021	0.046	0.032	0.559

组别	第8天	第9天	第10天	第11天	第12天	第13天	第14天
正常组	329.40 ± 13.78	333.00 ± 13.77	343.80 ± 12.11	351.80 ± 14.74	359.40 ± 14.88	362.00 ± 15.38	375.20 ± 15.87
抗生素灌胃组	342.60 ± 13.54	342.80 ± 13.54	348.60 ± 13.63	350.00 ± 9.25	365.40 ± 13.33	368.20 ± 13.29	373.40 ± 12.97
抗生素饮水组	300.20 ± 6.54	307.80 ± 5.07	313.80 ± 3.90	328.20 ± 9.68	352.60 ± 18.52	352.60 ± 17.70	366.40 ± 19.10
F 值	0.098	3.722	2.949	2.339	1.084	0.815	0.606
P 值	0.907	0.055	0.091	0.139	0.369	0.466	0.365

表 2 3组大鼠各脏器系数比较 (n=5, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	肝脏	肾脏	脾脏	胸腺
正常组	5.00 ± 0.34	0.29 ± 0.03	0.93 ± 0.02	0.20 ± 0.01
抗生素灌胃组	4.66 ± 0.47	0.25 ± 0.03	0.88 ± 0.07	0.20 ± 0.01
抗生素饮水组	4.03 ± 0.67	0.25 ± 0.05	0.91 ± 0.08	0.19 ± 0.01
F 值	4.687	2.141	0.793	1.000
P 值	0.310	0.160	0.475	0.397

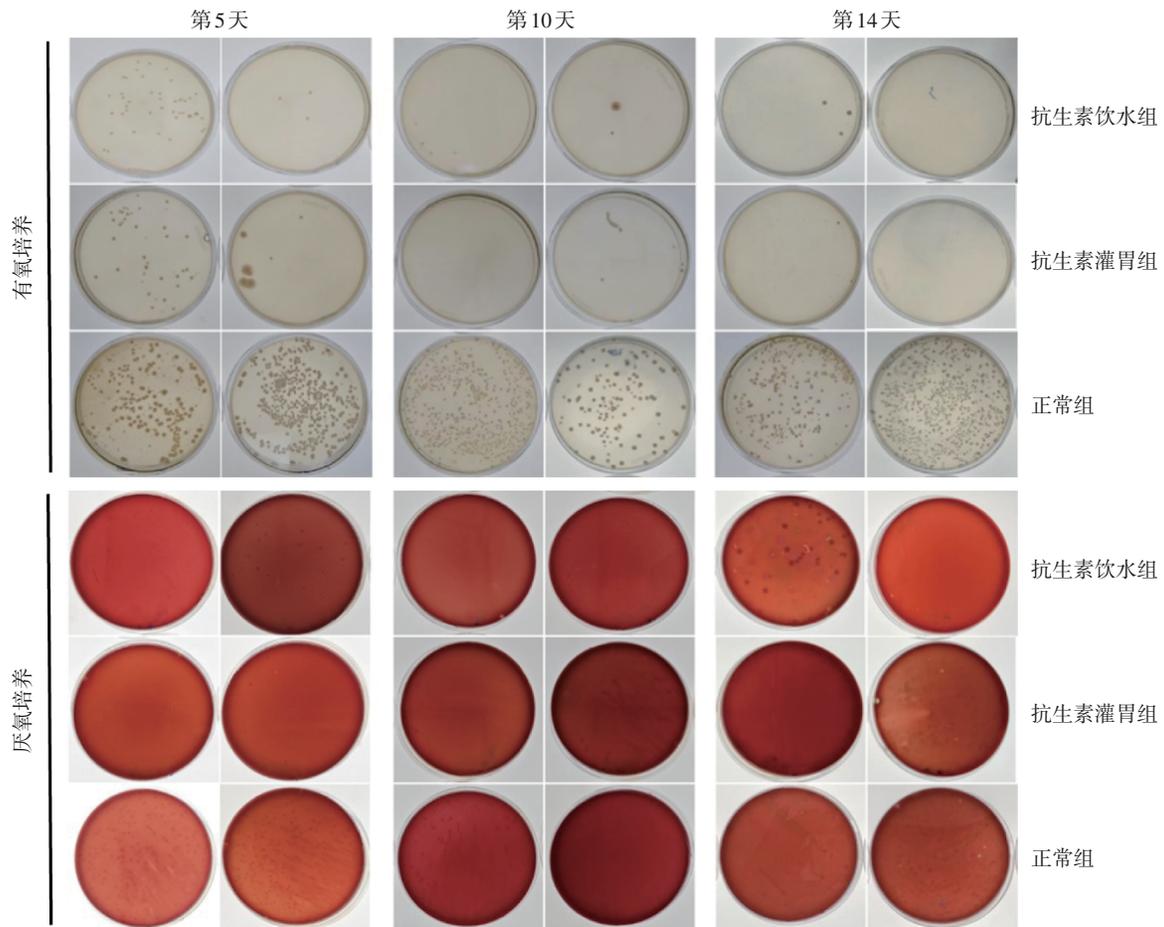


图 1 大鼠粪便体外培养

产生明显病理学损伤。见图2。

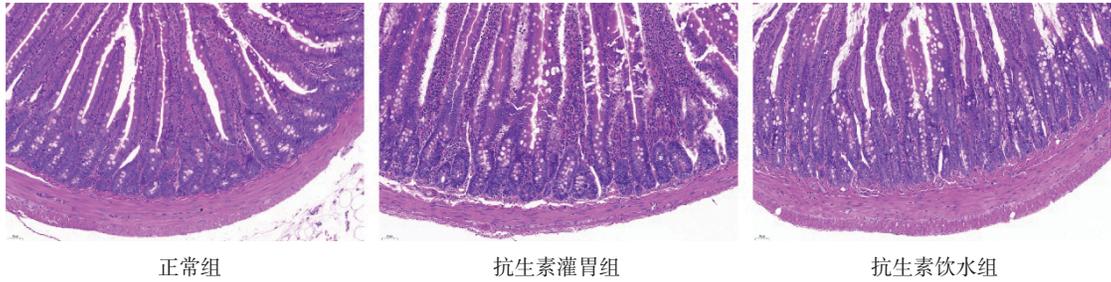


图2 各组大鼠结肠组织病理组织切片 (HE染色, 比例尺 50 μm, ×20)

2.5 各组大鼠结肠组织紧密连接蛋白的表达

各组大鼠结肠免疫组织化学结果显示,与正常组比较,抗生素灌胃组与抗生素饮水组中紧密连接蛋白ZO-1、Occludin在肠上皮和腺上皮细胞的细胞

质及细胞膜中呈阳性表达,棕黄色染色较多,见图3。说明短期内联合4种抗生素干预,大鼠结肠组织物理屏障未见明显损害。

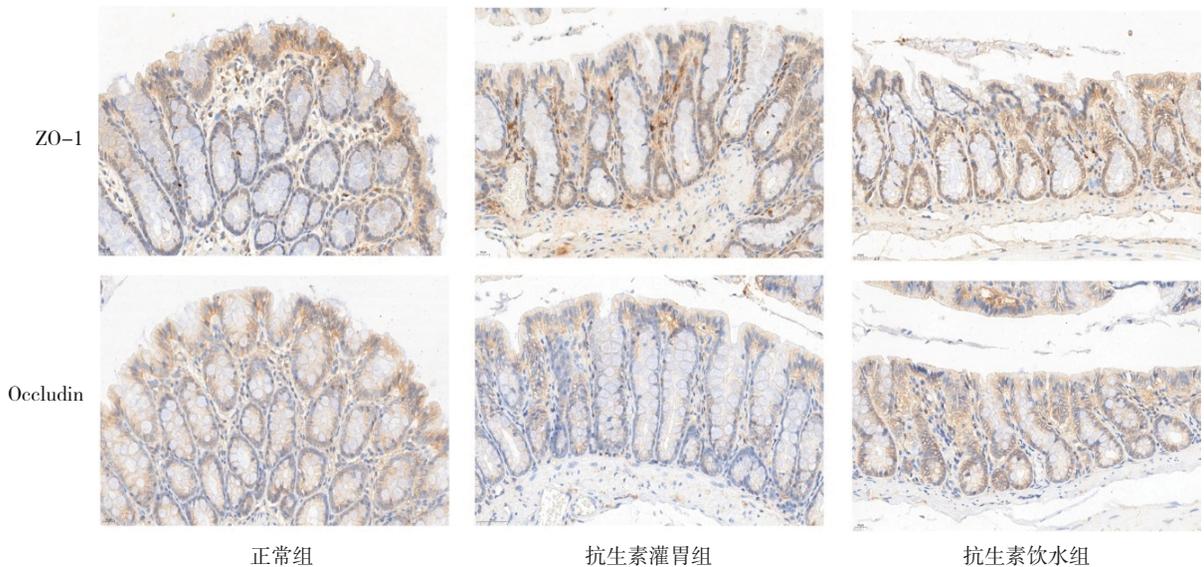


图3 各组大鼠结肠组织ZO-1、Occludin的表达 (免疫组织化学染色, 比例尺 20 μm, ×40)

2.6 各组大鼠肠菌多样性分析

3组样本共有ASV 2 874个。正常组、抗生素灌胃组、抗生素饮水组独有的ASV分别为2 257、35、522个,说明各组间肠道菌群ASV数量存在一定差异,且抗生素饮水组与抗生素灌胃组的特征ASV数量明显减少。见图4。

纳入全部15只大鼠的粪便样本,Rank-Abundance曲线结果表明,物种累积曲线趋缓,说明本研究的数据量充足且合理,且在抗生素干预后抗生素灌胃组与抗生素饮水组ASV丰富度显著降低。见图5。

基于16S rDNA测序的α多样性分析显示:3组大鼠的ACE、Sobs、Shannon、Simpson指数比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。两两比较显示:与正常

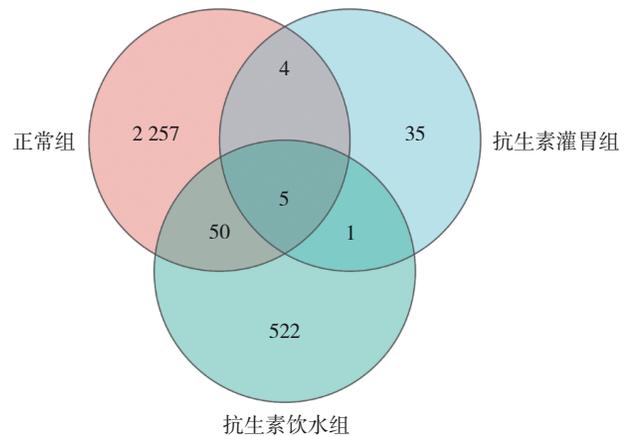


图4 韦恩图

组相比,抗生素灌胃组和抗生素饮水组的ACE、Sobs及Shannon指数均降低($P < 0.05$),Simpson指数均升高($P < 0.05$);抗生素饮水组的Simpson指数较抗生

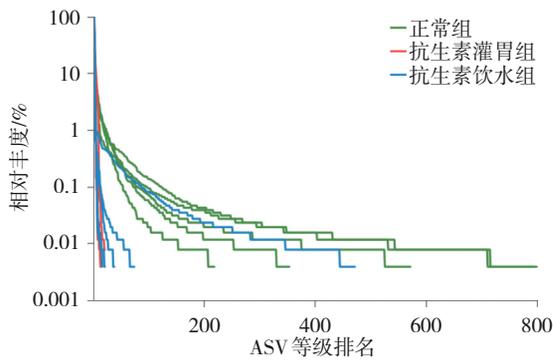


图5 Rank-Abundance 曲线

素灌胃组升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

基于 Bray-Curtis 距离的 β 多样性分析显示: 主坐标分析 (PCoA) 与非度量多维尺度分析 (NMDS) 均表明, 正常组样本与抗生素灌胃组、抗生素饮水组样本明显分离 (ANOSIM 相似性分析: $r = 0.816, P = 0.001$), 提示抗生素处理显著改变了大鼠肠道菌群结构; 抗生素灌胃组与抗生素饮水组样本聚集较近, 表明两组间菌群组成相似度较高。见图 6。

2.7 各组大鼠肠菌丰度与差异分析

各组菌群在门、属水平的整体组成见图 7。

表 3 各组大鼠肠道菌群 α 多样性分析 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	ACE	Sobs	Shannon	Simpson
正常组	568.55 ± 276.48	545.80 ± 260.03	3.85 ± 0.59	0.07 ± 0.03
抗生素灌胃组	13.26 ± 3.94 ^①	13.00 ± 4.00 ^①	1.02 ± 0.42 ^①	0.46 ± 0.14 ^①
抗生素饮水组	126.86 ± 199.89 ^①	123.00 ± 195.31 ^①	0.83 ± 0.96 ^①	0.74 ± 0.24 ^{①②}
F 值	11.089	11.220	29.746	21.879
P 值	0.002	0.002	0.000	0.000

注: ①与正常组比较, $P < 0.05$; ②与抗生素灌胃组比较, $P < 0.05$ 。

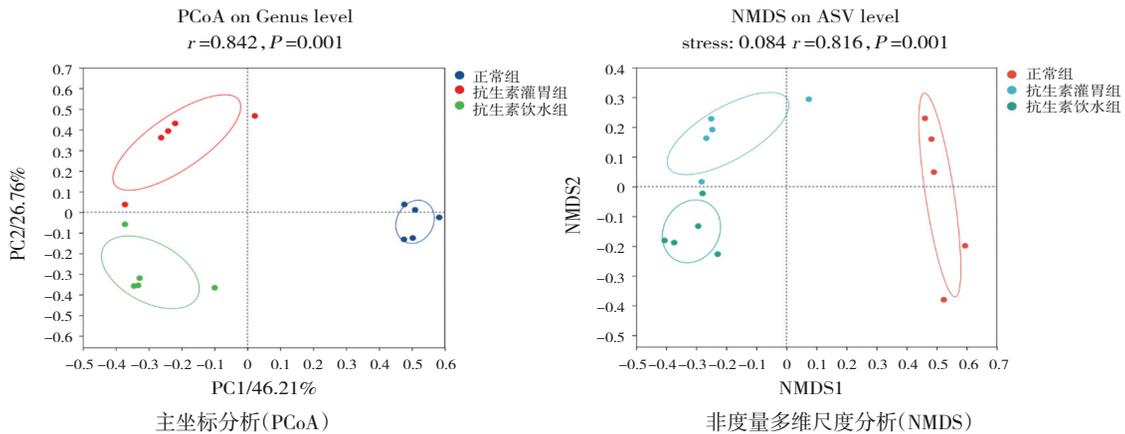
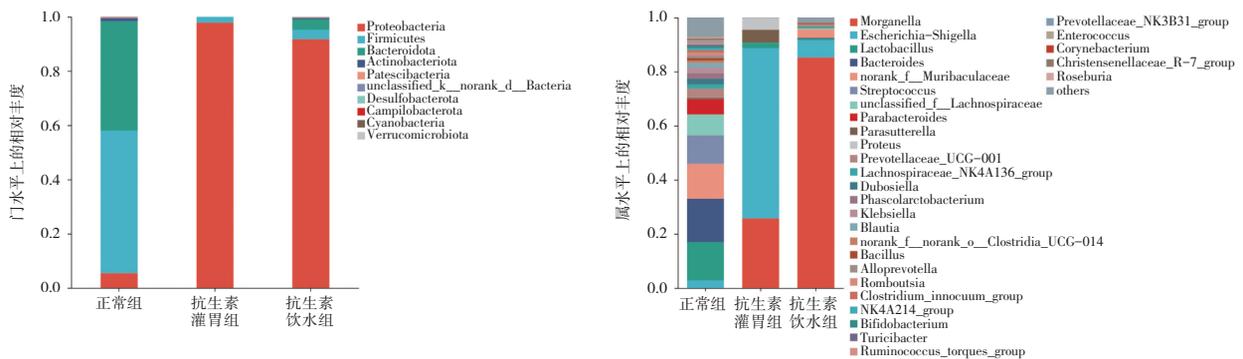


图6 基于 Bray-Curtis 距离的肠道菌群 β 多样性分析



Proteobacteria: 变形菌; Firmicutes: 厚壁菌; Bacteroidota: 拟杆菌; Actinobacteriota: 放线菌; Desulfobacterota: 脱硫杆菌; Campilobacterota: 弯曲菌; Cyanobacteria: 蓝细菌; Verrucomicrobiota: 疣微菌; Morganella: 摩根菌; Escherichia-Shigella: 埃希-志贺菌; Lactobacillus: 乳酸杆菌属; Streptococcus: 链球菌; Parabacteroides: 副拟杆菌; Parasutterella: 副梭特氏菌; Phascolarctobacterium: 考拉杆菌属。

图7 各组门、属水平上最丰富的菌群柱状图

Lefse 多级物种差异判别分析见图 8。在多层级进行差异检验, 分析差异物种, 并用 LDA 值来衡量物种

对差异效果的影响, 提示该物种可能在疾病的发生发展过程中起到的作用。

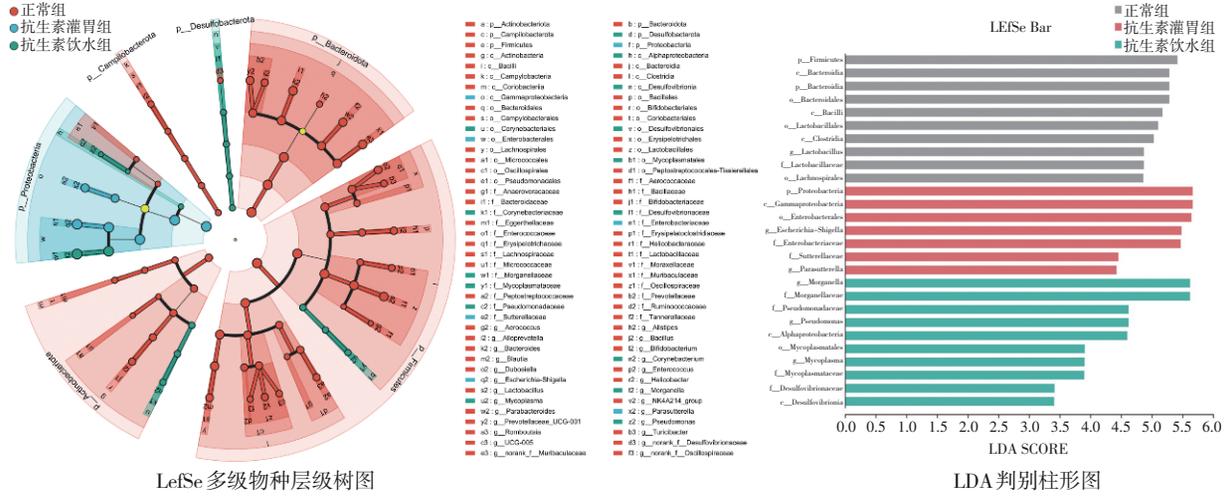


图 8 肠道菌群从门到属的 LefSe 分析

在门水平上, 3 组大鼠的变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidata)、放线菌门 (Actinobacteriota)、脱硫杆菌门 (Desulfobacterota) 的相对丰度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 抗生素灌胃组

和抗生素饮水组变形菌门丰度均高于正常组 (均 $P < 0.05$), 抗生素灌胃组与抗生素饮水组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 正常组厚壁菌门、拟杆菌门及放线菌门丰度高于抗生素灌胃组和抗生素饮水组 (均 $P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠门水平前 5 位差异物种比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	变形菌门	厚壁菌门	拟杆菌门	放线菌门	脱硫杆菌门
正常组	5.49 ± 5.37	52.55 ± 18.62	40.31 ± 14.73	1.17 ± 1.93	0.08 ± 0.05
抗生素灌胃组	97.83 ± 4.45	2.13 ± 4.45	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
抗生素饮水组	91.74 ± 15.46	3.52 ± 6.40	3.91 ± 8.18	0.39 ± 0.69	0.13 ± 0.29
H 值	10.220	10.220	11.667	9.733	8.382
P 值	0.006	0.006	0.003	0.008	0.015

在属水平上, 3 组大鼠的摩根菌属 (Morganella)、埃希-志贺菌属 (Escherichia-Shigella)、乳酸杆菌属 (Lactobacillus)、拟杆菌属 (Bacteroidota)、norank_f_Muribaculaceae 的相对丰度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 抗生素饮水组摩根菌

属丰度高于抗生素灌胃组和正常组 (均 $P < 0.05$); 抗生素灌胃组埃希-志贺菌属丰度高于抗生素饮水组和正常组 ($P < 0.05$); 正常组乳酸杆菌属、拟杆菌属及 norank_f_Muribaculaceae 属丰度高于抗生素灌胃组和抗生素饮水组 (均 $P < 0.05$)。见表 5。

表 5 3 组属水平前 5 位差异物种比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	摩根菌属	埃希-志贺菌属	乳酸杆菌属	拟杆菌属	norank_f_Muribaculaceae
正常组	0.00 ± 0.01	2.81 ± 2.56	14.19 ± 14.42	16.00 ± 15.20	12.92 ± 8.79
抗生素灌胃组	25.76 ± 21.98	62.88 ± 21.41	2.07 ± 4.48	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
抗生素饮水组	85.22 ± 16.21	6.42 ± 12.27	0.52 ± 0.96	0.30 ± 0.66	3.11 ± 6.95
H 值	12.727	9.62	8.029	10.876	9.535
P 值	0.002	0.008	0.018	0.004	0.009

2.8 各组大鼠肠菌微生物群的功能预测

为了探究肠道菌群的整体代谢景观,采用 Tax4Fun 对样品中的细菌进行了 KEGG 功能通路的预测。3 组的功能通路丰度特征见图 9, 抗生素灌胃组和抗生素饮水组表现出相似的功能途径丰度谱。各组功能途径的统计差异采用 R 语言(vega 包, 版本 2.5.3)进行分析, $P < 0.01$ 作为过滤显示功能预测结果。3 组大鼠肠道菌群功能预测结果表明:在碳水化合物代谢、氨基酸代谢、能量代谢、萜类化合物和聚酮类化合物代谢、辅助因子与维生素代谢等多个代谢途径上, 3 组差异显著, 见图 10。

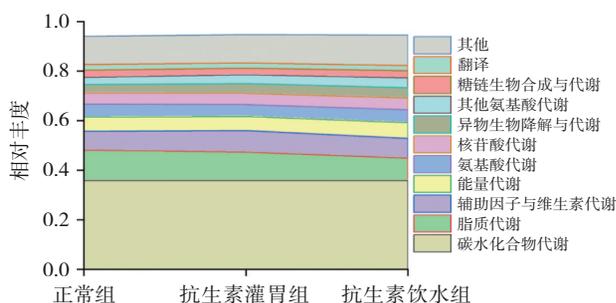
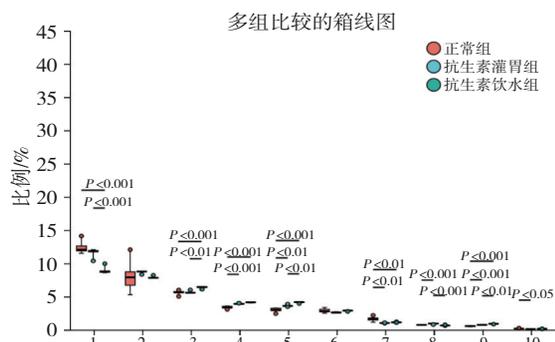


图 9 河流图

基于 KEGG 的菌群功能预测分析结果显示:在碳水化合物代谢、膜转运、氨基酸代谢、能量代谢、辅助因子与维生素代谢、核苷酸代谢、糖链生物合成与代谢、萜类化合物与聚酮类化合物代谢、传染



1:碳水化合物代谢; 2:膜转运; 3:氨基酸代谢; 4:能量代谢; 5:辅助因子与维生素代谢; 6:核苷酸代谢; 7:糖链生物合成与代谢; 8:萜类化合物与聚酮类化合物代谢; 9:传染病:细菌; 10:免疫系统。

图 10 3 组不同的代谢途径丰度差异分析

病:细菌、免疫系统途径上, 3 组预测丰度的总体比较, 经 Kruskal-Wallis H 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。经 Benjamini-Hochberg (BH) 法校正多重比较后, 与正常组相比, 抗生素灌胃组和抗生素饮水组在碳水化合物代谢、糖链生物合成与代谢的丰度降低(校正后 $P < 0.01$), 在氨基酸代谢、能量代谢、辅助因子与维生素代谢的丰度升高(校正后 $P < 0.01$); 与抗生素灌胃组相比, 抗生素饮水组在碳水化合物代谢、膜转运、萜类化合物与聚酮类化合物代谢的丰度降低(校正后 $P < 0.001$), 在氨基酸代谢及辅助因子与维生素代谢的丰度升高(校正后 $P < 0.01$)。见表 6。

表 6 3 组粪便微生物群功能预测结果 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	碳水化合物代谢	膜转运	氨基酸代谢	能量代谢	辅助因子与维生素代谢	核苷酸代谢	糖链生物合成与代谢	萜类化合物与聚酮类化合物代谢	传染病:细菌	免疫系统
正常组	12.43 ± 1.02	8.13 ± 2.54	5.60 ± 0.35	3.67 ± 0.20	2.95 ± 0.33	2.88 ± 0.33	1.64 ± 0.38	0.74 ± 0.02	0.55 ± 0.07	0.17 ± 0.05
抗生素灌胃组	11.58 ± 0.69	8.68 ± 0.21	5.67 ± 0.18	3.92 ± 0.05	3.62 ± 0.15	2.62 ± 0.07	1.03 ± 0.03	0.91 ± 0.07	0.77 ± 0.04	0.10 ± 0.01
抗生素饮水组	8.96 ± 0.56	7.90 ± 0.17	6.37 ± 0.16	4.11 ± 0.04	4.12 ± 0.10	2.86 ± 0.06	1.12 ± 0.04	0.66 ± 0.05	0.89 ± 0.03	0.14 ± 0.01
P 值	0.000 2	0.001 3	0.000 6	0.000 1	0.000 2	0.002 3	0.003 8	0.001 5	0.000 1	0.002 5
矫正 P 值	0.000 7	0.002 4	0.001 5	0.000 5	0.000 6	0.003 5	0.005 1	0.002 5	0.000 4	0.003 5

3 讨论

越来越多的研究表明, 肠道菌群结构变化对宿主有着深远的影响^[24-26], 伪无菌模型在这些领域得到了广泛的应用^[27-28]。然而, 伪无菌模型的研究并不充分, 该模型的应用也不规范和统一^[14,29]。许多研究使用氨苄西林钠、硫酸新霉素、甲硝唑和盐酸万古霉素来消耗大部分肠道细菌, 从而复制伪无菌

模型。在之前的研究中, 混合抗生素可以在 1 周内消耗相对丰富的肠道菌群^[17]。本研究发现, 抗生素暴露 5 d 后, 有氧及厌氧培养结果均显示, 抗生素灌胃组和抗生素饮水组处理均使菌落数显著减少。此外, 伪无菌模型在抗生素暴露 14 d 后, 大鼠结肠组织病理切片显示, 与正常组比, 抗生素灌胃组和抗生素饮水组的结肠组织结构完整, 杯状细胞稍增

多、帕内特细胞减少,隐窝完整。同时,与正常组相比,抗生素灌胃组和抗生素饮水组的ACE、Sobs及Shannon指数降低,物种丰富度和多样性均显著降低,说明抗生素灌胃和抗生素饮水两种策略均能复制伪无菌大鼠模型。

肠道菌群通过多种机制调控肠黏膜屏障功能,肠黏膜屏障由上皮细胞及细胞间紧密连接构成,ZO-1和Occludin作为结构性蛋白,维持屏障完整性,防止病原体 and 毒素渗透^[30]。益生菌及其代谢产物(如短链脂肪酸SCFAs)可显著增强紧密连接蛋白表达,促进调节性T细胞分化,抑制过度炎症,从而维持ZO-1和Occludin稳定性^[31]。本研究发现,抗生素灌胃组与抗生素饮水组大鼠结肠组织紧密连接蛋白ZO-1、Occludin在肠上皮和腺上皮细胞的细胞质及细胞膜中高表达,肠道组织屏障功能完整,未见明显的病理损伤。然而,抗生素暴露的第14天,抗生素灌胃组与抗生素饮水组大鼠结肠组织紧密连接蛋白ZO-1、Occludin在肠上皮和腺上皮细胞的细胞质及细胞膜中高表达,肠道组织屏障功能完整,未见明显的病理损伤。然而,抗生素暴露的第14天,抗生素灌胃组与抗生素饮水组大鼠结肠组织紧密连接蛋白ZO-1、Occludin蛋白表达较正常组稍降低。HOLOTA等^[32]发现,长期接触抗生素会增加肠黏膜通透性,这与短链脂肪酸水平降低有关,抗生素治疗引起的肠道菌群失调导致肠道黏膜通透性增加,这可能增加全身暴露于异种抗生素。

有研究发现,抗生素治疗导致大鼠肠道微生物群的紊乱,从而降低了氟尿嘧啶对结直肠癌的抗肿瘤效果^[33]。ZHANG等^[34]证实高原缺氧环境可导致粪便微生物群数量和组成的变化,说明肠道环境可改变肠道菌群,导致肠道菌群的个体差异。肠道菌群的这些变化可改变体内药物代谢活性,导致全身血液药物暴露增加,药物治疗效果降低。最近的一项报告显示,肾移植患者粪便中prausnitzii粪杆菌的丰度与口服他克莫司剂量呈正相关,他克莫司与prausnitzii粪杆菌孵育产生两种化合物^[35]。因此,在使用伪无菌模型探索肠道菌群对药物代谢差异的影响时,肠道菌群组成的比较研究至关重要。本研究发现,正常组与抗生素灌胃组和抗生素饮水组在不同分类水平上的肠道细菌分布存在显著差异。正常组主要由厚壁菌门和拟杆菌门组成,而抗生素

灌胃组与抗生素饮水组主要由变形菌门组成。此外,在科属水平上,正常组具有更大的丰富度和多样性,其中抗生素饮水组以摩根菌属、肠杆菌属、Muribaculum属为主,抗生素灌胃组以肠杆菌属、摩根菌属、萨特氏菌属为主。

肠道菌群作为药物代谢的一个重要但经常被忽视的组成部分已被越来越多地认识到。最近的研究发现,肠道菌群在伊立替康代谢和伊立替康腹泻毒副作用中发挥着越来越重要的作用^[36]。为了解肠道菌群在药物代谢中的作用,并比较和分析伪无菌模型中肠道菌群的功能,本研究基于KEGG代谢途径注释预测各组肠道菌群的功能。值得注意的是,与抗生素灌胃组和抗生素饮水组相比,正常组碳水化合物代谢途径的丰度显著增加。研究表明,胰岛素抵抗和胰岛素敏感性相关的肠道细菌可通过独特的碳水化合物代谢模式改善胰岛素抵抗^[37]。此研究亦表明,导致菌群分离的前10位代谢物包括几种氨基酸和发酵产物,如琥珀酸盐和富马酸盐,这些代谢物中的大多数优先由拟杆菌产生,这与本研究的物种组成研究成果一致。此外,其他代谢途径如碳水化合物代谢、萜类和多酮类代谢途径在抗生素灌胃组中明显降低,而氨基酸代谢及辅助因子和维生素代谢丰度显著升高,这表明饮水法与灌胃法大鼠的肠道菌群代谢功能发生了变化。

但本研究并未探讨肠道菌群如何影响药物代谢的个体差异及其参与药物代谢的过程。需要更先进的实验方法和更多的样本来探索伪无菌模型的异种代谢能力和更多的伪无菌模型的特征证据。

综上所述,本研究结果表明,联合抗生素灌胃和自由饮水给药均可在14 d内有效复制SD大鼠伪无菌模型,但抗生素灌胃组在维持动物体重稳定方面可能更具优势。值得注意的是,本研究中抗生素灌胃组与抗生素饮水组均出现条件致病菌异常繁殖现象(如埃希-志贺菌属、摩根菌属),这提示抗生素干预可能通过筛选压力改变菌群结构,使原本处于低丰度的潜在致病菌获得生长优势。这些非研究目标菌群的存在,可能通过代谢产物、定植竞争等途径影响实验变量,甚至引发机会性感染。因此,在利用伪无菌模型开展研究时,除关注目标菌群变化外,研究人员还需要考虑肠道通透性及肠道内非目标菌群的动态变化。在伪无菌模型中,肠道菌群的组成和代谢功能发生了巨大变化。这些发

现为研究者根据实验目标菌群选择适宜的抗生素给药策略复制伪无菌模型提供了深入的见解,并可能为未来的研究提供模型参考。

参 考 文 献 :

- [1] DELZENNE N M, BINDELS L B, NEYRINCK A M, et al. The gut microbiome and dietary fibres: implications in obesity, cardiometabolic diseases and cancer[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2025, 23(4): 225-238.
- [2] BAZACLIU C, ROIG J C, NEU J. Gastrointestinal (GI)-lung-brain axis[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2025, 30(2): 101639.
- [3] SONNENBURG E D, SONNENBURG J L. The ancestral and industrialized gut microbiota and implications for human health[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(6): 383-390.
- [4] ZHANG F, ASCHENBRENNER D, YOO J Y, et al. The gut mycobiome in health, disease, and clinical applications in association with the gut bacterial microbiome assembly[J]. *Lancet Microbe*, 2022, 3(12): e969-e983.
- [5] 于晓倩, 姜月华, 赵世腾, 等. 肠道菌群失调与血管内皮损伤的相关机制研究概况[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(5): 37-43.
- [6] 唐璐, 王春爱. 肠道菌群及代谢物在神经认知恢复延迟中作用的研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(5): 44-50.
- [7] LIU M, YUAN J, HU W J, et al. Pretreatment with broad-spectrum antibiotics alters the pharmacokinetics of major constituents of Shaoyao-Gancao decoction in rats after oral administration[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(2): 288-296.
- [8] WANG Z N, KLIPFELL E, BENNETT B J, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 57-63.
- [9] ZHONG X Q, ZHAO Y C, HUANG L, et al. Remodeling of the gut microbiome by *Lactobacillus johnsonii* alleviates the development of acute myocardial infarction[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1140498.
- [10] 李建香, 王君君, 黄天马, 等. 无菌鼠模型制作方法与评价[J]. *实验动物科学*, 2022, 39(3): 67-69.
- [11] 易萍. 无菌大鼠模型的建立及相关生物学特性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [12] WANG J X, WU Y H, YANG J Y, et al. Xylooligosaccharide and *Akkermansia muciniphila* synergistically ameliorate insulin resistance by reshaping gut microbiota, improving intestinal barrier and regulating NKG2D/NKG2DL signaling in gestational diabetes mellitus mice[J]. *Food Res Int*, 2025, 201: 115634.
- [13] LIU Y H X, LIU L, LUO J M, et al. Metabolites from specific intestinal bacteria *in vivo* fermenting *Lycium barbarum* polysaccharide improve collagenous arthritis in rats[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 226: 1455-1467.
- [14] LIANG W O, ZHAO L C, ZHANG J F, et al. Colonization potential to reconstitute a microbe community in pseudo germ-free mice after fecal microbe transplant from equol producer[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1221.
- [15] MU S C, XIANG H, WANG Y Z, et al. The pathogens of secondary infection in septic patients share a similar genotype to those that predominate in the gut[J]. *Crit Care*, 2022, 26(1): 68.
- [16] 崔瑾锦, 王璐璐, 蒋建东. 抗生素与肠道菌群[J]. *中国抗生素杂志*, 2025, 50(1): 1-5.
- [17] WANG S S, WEN Q Y, QIN Y, et al. Gut microbiota and host cytochrome P450 characteristics in the pseudo germ-free model: co-contributors to a diverse metabolic landscape[J]. *Gut Pathog*, 2023, 15(1): 15.
- [18] 亓照耀, 刘金存, 许源慧, 等. 两种给药途径对联合抗生素建立伪无菌大鼠模型比较[J]. *中国微生态学杂志*, 2023, 35(10): 1123-1129.
- [19] GHEORGHE C E, RITZ N L, MARTIN J A, et al. Investigating causality with fecal microbiota transplantation in rodents: applications, recommendations and pitfalls[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1941711.
- [20] LIN H T, CHEN S R, SHEN L, et al. Integrated analysis of the cecal microbiome and plasma metabolomics to explore NaoMaiTong and its potential role in changing the intestinal flora and their metabolites in ischemic stroke[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 773722.
- [21] ZHONG H, JIANG M R, YUAN K, et al. Alterations in gut microbiota and metabolites contribute to postoperative sleep disturbances[J]. *Animal Model Exp Med*, 2025, 8(6): 977-989.
- [22] XIAN M H, MA Z Q, ZHAN S K, et al. Network analysis of microbiome and metabolome to explore the mechanism of raw rhubarb in the protection against ischemic stroke via microbiota-gut-brain axis[J]. *Fitoterapia*, 2024, 175: 105969.
- [23] NAGY E, BOYANOVA L, JUSTESEN U S, et al. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 24(11): 1139-1148.
- [24] WANG H L, CAI Y S, WU W Q, et al. Exploring the role of gut microbiome in autoimmune diseases: a comprehensive review[J]. *Autoimmun Rev*, 2024, 23(12): 103654.
- [25] JIN Q Z, WANG S Y, YAO Y J, et al. The gut-eye axis: from brain neurodegenerative diseases to age-related macular degeneration[J]. *Neural Regen Res*, 2025, 20(10): 2741-2757.
- [26] 李泽桦, 曾宇宏, 郝卿璠, 等. 基于非靶向代谢组学的普雷沃氏菌对动脉粥样硬化小鼠作用机制[J]. *微生物学报*, 2025, 65(3): 1148-1161.
- [27] ZHANG W K, YU L H, YANG Q R, et al. Smilax China L. Polysaccharide prevents HFD induced-NAFLD by regulating hepatic fat metabolism and gut microbiota[J]. *Phytomedicine*, 2024, 127: 155478.
- [28] MA P, PENG Y, ZHAO L J, et al. Differential effect of polysaccharide and nonpolysaccharide components in Sijunzi decoction on spleen deficiency syndrome and their mechanisms[J]. *Phytomedicine*, 2021, 93: 153790.
- [29] ZHOU Y, WANG M Y, WANG Z C, et al. Polysaccharides from hawthorn fruit alleviate high-fat diet-induced NAFLD in mice by improving gut microbiota dysbiosis and hepatic metabolic disorder[J]. *Phytomedicine*, 2025, 139: 156458.
- [30] NEURATH M F, ARTIS D, BECKER C. The intestinal barrier: a pivotal role in health, inflammation, and cancer[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2025, 10(6): 573-592.

- [31] HUANG Y H, WANG Z J, YE B, et al. Sodium butyrate ameliorates diabetic retinopathy in mice via the regulation of gut microbiota and related short-chain fatty acids[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 451.
- [32] HOLOTA Y, DOVBYNCHUK T, KAJI I, et al. The long-term consequences of antibiotic therapy: role of colonic short-chain fatty acids (SCFA) system and intestinal barrier integrity[J]. *PLoS One*, 2019, 14(8): e0220642.
- [33] YUAN L, ZHANG S, LI H, et al. The influence of gut microbiota dysbiosis to the efficacy of 5-fluorouracil treatment on colorectal cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 184-193.
- [34] ZHANG J H, CHEN Y Y, SUN Y M, et al. Plateau hypoxia attenuates the metabolic activity of intestinal flora to enhance the bioavailability of nifedipine[J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 1175-1181.
- [35] GUO Y K, CRNKOVIC C M, WON K J, et al. Commensal gut bacteria convert the immunosuppressant tacrolimus to less potent metabolites[J]. *Drug Metab Dispos*, 2019, 47(3): 194-202.
- [36] MENG J J, ABU Y F, ZHANG Y, et al. Opioid-induced microbial dysbiosis disrupts irinotecan (CPT-11) metabolism and increases gastrointestinal toxicity in a murine model[J]. *Br J Pharmacol*, 2023, 180(10): 1362-1378.
- [37] TAKEUCHI T, KUBOTA T, NAKANISHI Y, et al. Gut microbial carbohydrate metabolism contributes to insulin resistance[J]. *Nature*, 2023, 621(7978): 389-395.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 贺莉, 颜家朝, 喻京生. 联合抗生素对伪无菌模型大鼠的肠道菌群及其代谢的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2026, 36(3): 32-43.

Cite this article as: HE L, YAN J C, YU J S. The effect of combined antibiotics on the intestinal flora and its metabolism in the construction of a pseudo germ-free rat model[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2026, 36(3): 32-43.