

# 无菌动物及其在微生物与宿主互作机制研究中的应用

石伟雄<sup>1,2</sup>, 李雪<sup>1,2</sup>, 朱华<sup>1,2</sup>, 苏磊<sup>1,2\*</sup>, 秦川<sup>1,2</sup>

1 中国医学科学院医学实验动物研究所 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021

2 中国医学科学院北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021

石伟雄, 李雪, 朱华, 苏磊, 秦川. 无菌动物及其在微生物与宿主互作机制研究中的应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 3773-3783.

SHI Weixiong, LI Xue, ZHU Hua, SU Lei, QIN Chuan. Application of germ-free animals in the research on the mechanisms of microorganism-host interactions[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(10): 3773-3783.

**摘要:** 无菌动物是指通过现代技术手段在其体内外的任何部位均检测不出细菌、真菌、放线菌、支原体、衣原体、螺旋体、立克次氏体、病毒、原生动物和寄生虫的动物。无菌动物因其不携带任何微生物, 可转化为携带特定微生物的动物, 同时因其免疫系统处于休眠状态, 对微生物感染异常敏感, 可建立多种悉生动物模型, 用于特定微生物感染实验和致病机制研究。此外, 无菌动物作为关键工具, 是研究菌群与疾病关系的核心, 在微生物与宿主健康、疾病和感染机制研究过程中, 起着不可替代的作用。本文将对无菌动物及其在微生物与宿主互作机制研究中的应用进行简要综述。

**关键词:** 无菌动物; 肠道微生物; 宿主健康; 机制

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFF0702900); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程计划(2021-I2M-1-039, 2021-I2M-1-034); 农业农村部农业微生物资源收集与保藏重点实验室开放基金(KLMRCP2021-09)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFF0702900), the Chinese Academy of Medical Sciences Initiative for Innovative Medicine of China (2021-I2M-1-039, 2021-I2M-1-034), and the Open Fund of Key Laboratory of Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (KLMRCP2021-09).

\*Corresponding author. Tel: +86-10-67777319, E-mail: [sulei@cnilas.org](mailto:sulei@cnilas.org)

Received: 2023-03-14; Accepted: 2023-06-06

# Application of germ-free animals in the research on the mechanisms of microorganism-host interactions

SHI Weixiong<sup>1,2</sup>, LI Xue<sup>1,2</sup>, ZHU Hua<sup>1,2</sup>, SU Lei<sup>1,2\*</sup>, QIN Chuan<sup>1,2</sup>

1 NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

2 Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

**Abstract:** Germ-free animals refer to the animals in which bacteria, fungi, actinomycetes, mycoplasma, chlamydia, spirochetes, rickettsia, viruses, protozoa, and parasites cannot be detected in any part of the body and *in vitro* by modern technologies. Since germ-free animals do not carry any microorganism, they can be modeled into the animals carrying specific microorganisms. Because of the dormant immune system, germ-free animals are extremely sensitive to microbial infections. A variety of gnotobiotic animal models can be established for specific microbial infection experiments and pathogenic mechanism research. As a key tool, germ-free animals are pivotal in studying the relationship between microbiome and diseases and play an irreplaceable role in the research on the relationship between microbiome and host health and the mechanisms of infections. We briefly introduce germ-free animals and review the applications of germ-free animals in the research on the mechanisms of host-microorganism interactions.

**Keywords:** germ-free animals; intestinal microbiome; host health; mechanism

2007年,人类微生物组计划启动,目的是增加与人类健康和疾病相关的微生物群落组成和功能的认识。人体内拥有庞大的微生物群落,其数量估计为100万亿,大约是人体细胞数量的10倍,另外,微生物编码的独特基因数大约是人体细胞基因组的100倍<sup>[1]</sup>。微生物在人出生时就开始定殖在人体各部位,包括皮肤、胃、肠等组织,其中肠道中的微生物数量最多<sup>[2]</sup>。自1995年开始,肠道菌群研究引起广泛关注,这些微生物在肠道中通常发挥重要功能,包括直接防御病原体,通过其在肠道上皮细胞发育和维持以及诱导抗体产生中的作用加强宿主防御,以及代谢食物中难消化的化合物<sup>[3]</sup>。肠道

菌群研究前期主要围绕微生物组学研究,探究肠道微生物组成,发现新的肠道新物种。随后,集中在微生物与宿主互作机制的研究,比如研究其在免疫系统中的作用机制,以及在肠-脑轴<sup>[4-5]</sup>或肠-肝轴<sup>[6-8]</sup>中的作用等。彻底研究清楚肠道微生物在人类疾病和健康中的作用和功能仍然是医学研究中的重点难题之一。

到目前为止,冠心病、神经退行性疾病等重大慢性疾病相关的悉生动物、粪菌移植和菌群人源化动物模型已大量应用于人类疾病发生机制的研究,这些动物模型也被广泛应用于评估微生物功能或药物对宿主健康和疾病影响<sup>[8-10]</sup>。但是,肠道微生物在宿主健康和疾病

中的作用机制在很大程度上仍然是未知的。近年来, 无菌动物(germ-free animals, GF)常被用作肠道微生物与宿主健康与疾病互作机制研究的工具<sup>[11-12]</sup>。与传统饲养动物和未知菌动物相比, 悉生动物(gnotobiotic)模型为微生物与宿主互作机制研究提供了一个更加简单且直接的实验动物模型<sup>[13]</sup>。越来越多的生物医学研究通过关键细菌、基因和饮食因素精确有效地控制无菌动物的微生物群, 建立符合研究需要的个性化无菌动物模型。近些年, 使用无菌动物模型发表的文章也呈现逐年快速增加的趋势(图 1)。

## 1 无菌动物

无菌动物概念是路易·巴斯德(Louis Pasteur)在 1885 年提出的, 无菌动物是指在动物一生中, 体内外的任何部位在现代检测技术手段下均检测不出微生物, 包括细菌、真菌、放线菌、支原体、衣原体、螺旋体、立克次氏体、病毒、原生动物和寄生虫的动物<sup>[14]</sup>。按照我国现行国标 GB14922.1—2001 和 GB14922.2—2011 规定

的微生物等级, 实验动物分为普通级(conventional animal, CV)、清洁级(clean animal, CL)、无特定病原体级(specific pathogen-free animal, SPF)和无菌级。无菌级动物为最高级别的实验动物, 是指通过剖宫产手术或无菌胚胎移植进行无菌化获得, 利用无菌饲养方法维持于无菌隔离器中, 使用现有方法检测不到活的微生物和寄生虫的动物。值得注意的是, 2023 年 7 月 1 日起实施的新国标——《实验动物微生物、寄生虫学等级及检测》(GB14922—2022)取消了清洁级动物。悉生动物是指有选择地被一种或多种已知细菌定殖的无菌动物<sup>[15]</sup>。无菌动物为研究人类健康、疾病和病原微生物在宿主中的致病机制提供了宝贵的实验工具<sup>[16]</sup>。无菌动物模型涉及多个物种、多种动物, 包括无菌小鼠<sup>[17]</sup>、无菌大鼠<sup>[18]</sup>、无菌斑马鱼<sup>[19]</sup>、无菌狗<sup>[20]</sup>、无菌鸡<sup>[21]</sup>和无菌猪<sup>[22]</sup>等物种模型。中国医学科学院医学实验动物研究所是国内最早从事无菌动物繁育和研究的单位之一, 建有无菌大小鼠、豚鼠、兔和蚕等无菌动物。无菌动物需要始终饲养在设有双重气锁和高效空气过滤器并保证是无菌状态的隔离器中。

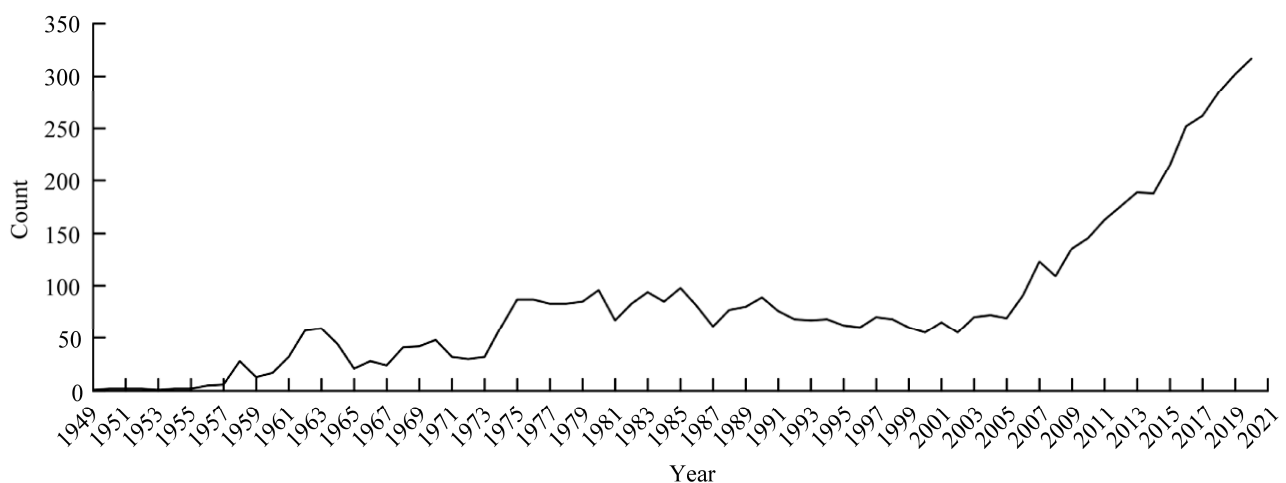


图 1 无菌动物在 NCBI-PubMed 中的论文数量

Figure 1 The number of papers on germ-free animals in NCBI-PubMed.

## 1.1 无菌动物的制备方法

目前主要采用剖宫产净化(cesarean section purification)和无菌胚胎移植(embryo transfer)技术实现哺乳类实验动物的无菌化。剖宫产净化是通过剖宫产手术摘除动物的全子宫,把子宫通过灭菌渡槽传入隔离器内剥离仔畜,仔畜通过人工喂养或已有的无菌动物带乳方式获得。此方法的特点是简单、易操作,但制备效率低,且个别微生物和寄生虫可通过胎盘屏障垂直感染;无菌胚胎移植方法是将无菌小鼠作为受体鼠,获得供体鼠的无菌胚胎后移植到无菌受体小鼠体内,让其自然分娩获得无菌小鼠种群,此方法的特点是制备效率高,但需要经过培训的专业人员和设备。无论采用何种方式制备,离乳或分娩后均需进行微生物检测,始终在隔离器中饲养,饲料、垫料和水均需高压灭菌处理,保证是无菌的,以维持和繁殖新的无菌动物品系<sup>[15]</sup>,而鸟类及鱼类等其他卵生动物,则在卵表面进行消毒的基础上,在无菌环境里进行孵化、培育(表 1)。

因为第一代无菌动物的母本不是无菌的,其携带的病毒、细菌和细菌代谢物可能通过胎盘传递给胎儿,因此建议使用二、三代及以后的无菌动物做实验。在培育无菌动物过程中,需要定期监测无菌动物的无菌状态。

## 1.2 无菌动物的生物学检测

无菌动物在繁育过程中容易受环境中微生物的污染。因此,新繁育的无菌动物是否达到应有的微生物等级,在饲养和实验过程中是否被微生物污染等需要通过生物学监测来确定。研究人

员在无菌动物繁育及实验过程中要定期对动物的生活环境、饲养用品、动物粪便及活体等进行微生物学检测。对无菌动物的无菌状态的检测通常使用 3 种筛查实验,包括厌氧和好氧微生物液体培养、革兰氏染色以及通用性和特异性 16S 或 ITS rDNA 测序<sup>[15]</sup>。目前,国内对于无菌状态检测通常依据 GB/T14926.41、43—2001 和 GB14922.2—2011 的方法,通过微生物培养和革兰氏染色筛查无菌状态。

## 1.3 无菌动物的生物学特征

在研究无菌动物的生物学特征过程中,需设立相同遗传背景的无特定病原体动物作为无菌动物的对照组<sup>[15]</sup>。SPF 级动物应该与无菌动物保持相同的生活环境。同时,需要对 SPF 级动物进行病原体筛选和测试<sup>[23]</sup>。另外还需要对无菌动物的血液学、解剖学、组织学等特点进行系统的比较医学研究<sup>[8-10]</sup>。研究发现无菌动物和 SPF 级动物在解剖学和生理学等许多生理学特征方面存在差异(表 2)。

例如,无菌小鼠的盲肠体积增大了 4-8 倍,盲肠扩大似乎不会特别损害动物的健康。成年无菌动物的小肠发育较差,比 SPF 级啮齿动物的小肠表面积小得多,蠕动速度也慢得多,无菌动物的上皮细胞更新变慢。因此,无菌动物利用营养的能力受到了损害,其体重比 SPF 级动物轻。无菌动物的免疫系统与 SPF 级动物明显不同,也更容易被感染<sup>[24]</sup>。研究发现,无菌小鼠大脑中与肥胖相关的多肽表达增加,如胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1)的增加减少了无菌动物的摄食量<sup>[26-27]</sup>,无菌小鼠从饮食中提取能量的效率较低,比正常小鼠更瘦,体脂更少。因此,无菌动物的饲料应该补充维生素 K 和维生素 B<sup>[24]</sup>。同时,无菌小鼠的社交行为明显减少,但这种变化通常可以正常化,如通过粪菌移植,使其社交行为得到改善或恢复<sup>[28]</sup>。另外,啮齿类动物中,与 SPF 级大鼠相比,无菌大鼠寿命更长,患自发性癌症的几率更低<sup>[24]</sup>。

表 1 不同无菌动物的制备方法的比较

Table 1 Comparison of preparation methods of different germ-free animals

Species	Example	Preparation method
Viviparous animals	Rat, mouse, monkey	Cesarean section, germ-free isolator
Oviparous animals	Zebra fish, chicken	Germ-free incubator, biosafety cabinet

表 2 无菌动物与 SPF 级动物的生理学特征比较<sup>[24]</sup>Table 2 Compared to physiological features of germ-free animals and SPF animals<sup>[24]</sup>

Characteristic	Germ-free animal	SPF animal
Nutrition	Requirement for vitamins K and B in feed; increased intake of food and water	Vitamin K and B do not need to be added to feed; Normal food and water intake
Metabolism	Decreased basal metabolic rate; increased secretion of free amino acids and urea and little excretion of acetic acid; more nitrogen in the cecal contents and feces	Metabolism normal
Circulation	Reduced total volume of blood; decreased cardiac output; decreased blood flow to skin, liver, lungs, and digestive tract; increased cholesterol level and numbers of red blood cells in blood	Circulation including total volume, cardiac output, cholesterol level and red blood cells count is normal
Liver	Reduced liver size	The liver size is normal
Lungs	Thinner alveolar and capsular walls; fewer reticuloendothelial elements	The alveolar, capsular walls and reticuloendothelial elements is normal
Intestinal morphology	Reduction in total intestinal mass; decrease in the total surface area of the small intestine; slender and uniform villi of the small intestine; shorter ileal villi and longer duodenal villi; shorter crypts of the small intestine; lamina propria of the small intestine thinner, with fewer cells and slower cell renewal; larger cecum with a thinner wall	The intestinal morphology is normal
Intestinal function	Enhanced absorption of vitamins and minerals, alterations in the absorption of other ingested materials; altered enzyme content, elevated levels of trypsin, chymotrypsin and invertase in the feces; high levels of mucoproteins and mucopolysaccharides in the feces; less fatty acids and no cyclic or branched-chain fatty acids in the intestinal content, excretion of primarily; unsaturated fatty acids	The intestinal function is normal
Endocrine function	Thyroid iodine uptake decreased and response to epinephrine, norepinephrine and vasopressin decreased	The endocrine function is normal
Systemic immunity	Plasma cell decrease, immunoglobulin level decreased, white blood cell count decreased, oxygen concentration of pulmonary macrophages decreased, immunoglobulin and immunoglobulin response to DNP-BSA decreased	The immune system is in an activated state
Infection susceptibility/response	More susceptible to <i>Shigella flexneri</i> , <i>Bacillus anthracis</i> and <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , and lower antibody response to <i>Escherichia coli</i> <sup>[25]</sup>	Show the characteristics of insusceptibility

## 2 无菌动物在微生物与宿主互作机制研究中具有广泛的应用

无菌动物作为关键工具,是研究菌群与疾病关系的核心,在微生物与宿主健康、疾病和感染机制研究过程中,起着不可替代的作用。无菌动物模型可用于建立研究饮食干预模型,脑肠轴、肝肠轴、菌群-肿瘤相关性、药物-菌群互作等宿主健康和疾病相关领域。无菌动物因其菌群特征可以推动因果性研究的发展,提供可靠的研究证据,在微生物与宿主互作机制研究中具有广泛的应用。目前常见的无菌动物模型包括神经退行性

疾病、心血管疾病、代谢性疾病动物模型等模型资源,这为肠道菌群靶点药物研发、机制研究和成果转化提供有力保障。

### 2.1 无菌动物在微生物与宿主健康研究中的应用

饮食干预与肠道菌群的关系是当前研究宿主健康与微生物关系的研究热点,肠道微生物为有关疾病的预防、诊断和治疗提供了新的思路。无菌动物模型在研究宿主健康与微生物互作机制中起到关键作用。Ficara 等<sup>[29]</sup>通过比较无菌小鼠与普通小鼠生理指标的变化,证实了肠道菌群会对机体产生影响。Teixeira 等<sup>[30]</sup>利用无菌动物

模型证实饮食的不健康会造成肠道菌群失调,引发肠屏障功能受损,导致相关代谢性疾病发生。肠道菌群的多样性与饮食习惯密切相关。Wostmann 等<sup>[31]</sup>通过研究发现,将传统小鼠的盲肠微生物移植到无菌小鼠体内,饲养两周后,无菌小鼠脂肪总量增加 60%,同时伴随着胰岛素拮抗、脂肪细胞肥大以及瘦素和血糖水平的升高。这可能因为肠道微生物能够将不可消化的多糖降解为可被吸收的单糖,从而增加宿主肝脏脂肪的合成。移植的肠道微生物群能够抑制肠道中血管生成素样蛋白-4 (angiopoietin-like 4, ANGPTL4/fastening-induced adipocyte factor, FIAF)的表达,血管生成素样蛋白-4 是一种脂蛋白脂酶循环抑制因子。因此,无菌小鼠接受肠道微生物移植后,脂肪细胞脂蛋白脂酶活性增加,导致增加摄取脂肪酸含量,加速积累脂肪细胞甘油三酯<sup>[32]</sup>。但是, Fleissner 等<sup>[33]</sup>研究了不同日粮对无菌小鼠和普通小鼠体成分的影响,研究发现,肠道微生物的缺乏不能对饮食诱导的肥胖起到拮抗作用,肠道中血管生成素样蛋白-4 与肠道微生物介导的脂肪储存效应没有因果关系。同时, Jacouton 等<sup>[34]</sup>研究发现鼠李糖乳杆菌 CNCMI-4317 单一定殖到无菌小鼠体内能够增加血浆中 IL-7 和 FIAF 的含量水平,并调节肠道 FIAF 基因的表达,但是定殖无菌小鼠体重增加没有显著性。肠道微生物与肥胖关系的具体机制还需要进一步研究。通过无菌小鼠模型研究发现,肠道共生微生物产生的醋酸盐通过调节小鼠肝脏游离脂肪酸受体 2 信号通路来抑制非酒精性肝病和非酒精性脂肪肝的发生,菊粉等益生元在调节过程中发挥了重要作用<sup>[35]</sup>。高脂高糖的饮食会导致肠道菌群的变化,影响机体代谢过程,严重者引发机体全身炎症变化,造成多种疾病的发生发展<sup>[36]</sup>。在保证胃肠功能以及维持肠道菌群的平衡中,膳食纤维发挥了重要的作用。

茶多酚饮食能够对肠道菌群紊乱具有调节作用,能够减轻肠道菌群丰富度和生物多样性降低的症状<sup>[37]</sup>。膳食多酚能够调节肠道菌群的多样性和丰富度,对维持肠道健康具有积极的影响。另一方面,人类的衰老也与肠道微生物区系组成的显著变化有关,微生物多样性的丧失在衰老的肠道中也很明显<sup>[38]</sup>。衰老是由遗传因素和环境因素之间的复杂相互作用决定的。肠道微生物群是许多与年龄相关变化的核心,包括免疫系统失调和疾病易感性等。在整个生命周期中,肠道微生物群随着年龄变化而发生广泛的变化,同时伴随着相关的代谢变化。Thevaranjan 等<sup>[39]</sup>发现与有肠道微生物的小鼠相比,无菌小鼠与年龄相关的肠道功能障碍和炎症减轻了。此外,将年轻的无菌小鼠与老年野生型小鼠共同居住,会导致微生物定殖在年轻无菌小鼠肠道中,并显著增加肠道通透性和炎症标识物,这表明微生物群可以随着年龄发生“老化”,而与年龄相关的慢性炎症可能取决于肠道微生物群<sup>[39]</sup>。

## 2.2 无菌动物在微生物与宿主疾病作用机制研究中的应用

肠道菌群广泛影响人类疾病,包括皮肤病、口腔疾病<sup>[40]</sup>、肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)<sup>[41]</sup>、过敏性疾病<sup>[42]</sup>、神经性疾病<sup>[43]</sup>、代谢性疾病<sup>[44]</sup>和精神障碍疾病<sup>[45]</sup>等。肠道菌群和中枢神经系统之间的相互交流已变得越来越明显。脑-肠轴是肠道与大脑之间的双向功能通讯网络,涉及神经、免疫、内分泌和代谢途径。在益生菌干预无菌动物模型的研究表明,肠道微生物在宿主与疾病如阿尔茨海默症、抑郁症和帕金森症等相关机制研究中发挥着重要作用<sup>[46]</sup>。GF 小鼠表现出成年海马神经炎症发生的增加,成年海马神经炎症发生在认知过程中起到重要的作用<sup>[47]</sup>,GF 小鼠表现出小胶质细胞的不成熟和缺陷,导致先天性免疫反应受损,这可能

导致包括阿尔茨海默病在内的神经系统疾病的发病。与 SPF 小鼠相比,在 GF 小鼠大脑皮层和海马区的 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体 2A (NR2A)的表达量降低。在 GF 小鼠的中央杏仁核中, NMDA 受体 NR2B 亚单位的 mRNA 下调。NMDA 受体在突触可塑性和认知功能中也起着关键作用<sup>[48]</sup>。这些通过脑肠轴进行的交流可能受到肠壁和血脑屏障通透性变化的调节。在无菌条件下,无菌动物的血脑屏障更具有渗透性,肠道微生物群产生的短链脂肪酸、去甲肾上腺素和组胺等代谢产物通过脑肠轴途径调节大脑的一系列生理过程<sup>[49]</sup>。肠道菌群还对大脑和行为产生一定的影响,包括焦虑和抑郁,认知功能,社会行为和内脏疼痛等。从患有严重抑郁症患者的粪便微生物移植到 GF 小鼠肠道内,GF 小鼠诱导出了类似抑郁的表型<sup>[46]</sup>。在利用无菌动物疾病模型进行益生菌干预治疗过程中发现,益生菌可以改变大脑活动,调节情绪变化<sup>[50]</sup>。肠道菌群可以影响动物社会行为,无菌动物表现出新的社会行为偏好,当无菌小鼠断奶后进行菌群移植,可以使动物行为正常化,值得注意的是,脆弱拟杆菌作为益生菌,可以改善肠道屏障功能,改变刻板印象行为<sup>[51]</sup>。研究表明,肠道微生物群可通过直接或间接机制调节犬尿氨酸途径代谢的色氨酸利用情况从而对中枢神经系统功能产生下游影响,为脑肠轴研究提供新见解<sup>[49]</sup>。中国医学科学院医学实验动物研究所建立了国内第 1 个无菌 APP/PS1、ApoE 小鼠模型,为研究肠道菌群与阿尔茨海默症关系提供新的动物模型<sup>[52]</sup>。综上所述,无菌动物在阐明宿主疾病与微生物互作的潜在机制方面是有积极作用的。

### 2.3 无菌动物在微生物感染与宿主互作机制研究中的应用

对无菌动物的研究表明,微生物群对免疫系统的发育和成熟必不可少,病原微生物的入侵会

激发机体产生免疫反应,无菌动物作为研究病原微生物对免疫系统发育和功能影响的重要工具,广泛应用在病原微生物和宿主互作机制的研究中。无菌小鼠的单核吞噬细胞和小胶质细胞在刺激下不能产生各种细胞因子和趋化因子,同时,无菌小鼠在针对病毒的免疫反应中,无菌小鼠中的常规树突状细胞(conventional dendritic cells, cDCs)功能低下,尤其是各种炎症细胞因子产生减少,因此他们更容易受到病原微生物的感染<sup>[53]</sup>。幽门螺杆菌是一种引起胃溃疡疾病的革兰氏阴性菌,患者会患有低度炎症。为了评估感染幽门螺杆菌是否会影响自身的生长,可通过测定无菌小鼠和 SPF 小鼠在感染幽门螺杆菌后,体内特定肠道激素的表达水平变化来确定。研究发现,感染幽门螺杆菌的无菌小鼠表现出胃饥饿素、瘦素和胰岛素的增加,暴露于幽门螺杆菌会改变生命早期的宿主代谢,SPF 小鼠的共生微生物群可以减弱幽门螺杆菌对自身生长的抑制作用<sup>[54]</sup>。沙门氏菌属引起的病症是一种全球性分布的急性传染病,人类感染后表现出发烧、腹泻、严重者可引起致命的败血症。沙门氏菌感染无菌小鼠后可明显引起无菌小鼠的回肠和肝脏组织损伤等变化,植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌发酵后的乳汁饲喂无菌小鼠后,回肠和肝脏损伤状态缓解,这可能是通过宿主免疫调节实现的<sup>[55]</sup>。金黄色葡萄球菌常引起皮肤感染等疾病, Park 等<sup>[56]</sup>通过转录组学分析,与 SPF 小鼠相比较,无菌小鼠皮肤中的 I 型干扰素(interferon, IFN)信号下调,干扰素信号的减少与巨噬细胞特异性标志物 CD169<sup>+</sup>密切相关,而缺乏 CD169<sup>+</sup>会使机体对金黄色葡萄球菌造成的皮肤感染的免疫反应减弱。轮状病毒和诺如病毒是世界范围内引起急性肠胃炎的主要原因,肠道菌群是影响肠道病毒感染的第二大因素,尽管有大量证据表明肠源性细菌能够抑制病毒感染,但在研究病毒感染无菌小鼠

实验时,发现一定的肠道菌群在一定程度上促进病毒感染宿主,例如肠道菌群通过稳定病毒颗粒,促进病毒附着于宿主细胞,或通过改变抗病毒免疫反应等间接增强肠道病毒的感染<sup>[57]</sup>。此外,无菌小鼠在疫苗研发和药物评价上发挥重要作用,中国医学科学院医学实验动物研究所通过将无菌豚鼠应用于EV71病毒感染研究,为EV71比较医学的研究和疫苗保护性效果标准的建立提供了依据<sup>[58]</sup>。同时,为手足口疫苗、轮状病毒疫苗和人戊型肝炎疫苗的研制和评价提供了悉生动物模型。

### 3 展望

在近20年的微生物组研究中,肠道微生物在肿瘤、代谢性疾病、神经退行性疾病和肠道疾病等研究过程中发挥了重要作用,但在这些疾病发生机制方面仍有很多科学问题亟需阐述。无菌动物作为研究肠道微生物与疾病互作机制的重要工具,可以为这些疾病的预防和治疗提供新策略。随着微生物组从基础性研究转向应用性研究,进入功能微生物组时代,无菌动物研究领域呈现出新的特点和新的发展趋势,如呈现多样化和功能化特点,这也使无菌动物种类成倍增加。随着无菌动物技术逐渐趋于完善,可以为微生物组功能研究提供支撑,为疫苗、活菌药物、功能食品、天然活性成分等产品的研发和安全性有效性评价提供保障。

### 参考文献

[1] QIN JJ, LI RQ, RAES J, ARUMUGAM M, BURGDORF KS, MANICHANH C, NIELSEN T, PONS N, LEVENEZ F, YAMADA T, MENDE DR, LI JH, XU JM, LI SC, LI DF, CAO JJ, WANG B, LIANG HQ, ZHENG HS, XIE YL, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. *Nature*, 2010, 464(7285): 59-65.

[2] de VOS WM, TILG H, Van HUL M, CANI PD. Gut

microbiome and health: mechanistic insights[J]. *Gut*, 2022, 71(5): 1020-1032.

- [3] GIBSON GR, ROBERFROID MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics[J]. *The Journal of Nutrition*, 1995, 125(6): 1401-1412.
- [4] GÓRALCZYK-BIŃKOWSKA A, SZMAJDA-KRYGIER D, KOZŁOWSKA E. The microbiota-gut-brain axis in psychiatric disorders[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 11245.
- [5] HILLESTAD EMR, van der MEEREN A, NAGARAJA BH, BJØRSVIK BR, HALEEM N, BENITEZ-PAEZ A, SANZ Y, HAUSKEN T, LIED GA, LUNDERVOLD A, BERENTSEN B. Gut bless you: the microbiota-gut-brain axis in irritable bowel syndrome[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2022, 28(4): 412-431.
- [6] MARTÍN-MATEOS R, ALBILLOS A. The role of the gut-liver axis in metabolic dysfunction-associated fatty liver disease[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 660179.
- [7] ALBILLOS A, de GOTTARDI A, RESCIGNO M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy[J]. *Journal of Hepatology*, 2020, 72(3): 558-577.
- [8] 朱华, 刘小海, 李卓, 郭亚茜, 杜晓鹏, 苏磊, 李永宁, 秦川. 建立阿尔茨海默症人源肠道菌群动物模型[J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(1): 55-62.
- ZHU H, LIU XH, LI Z, GUO YX, DU XP, SU L, LI YN, QIN C. Establishment of a human flora-associated mouse model correlated with Alzheimer's disease[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2021, 29(1): 55-62 (in Chinese).
- [9] 朱华, 郭亚茜, 杜晓鹏, 李卓, 苏磊, 秦川. 基于LC-MS的冠心病病人源菌群小鼠代谢组学研究[J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 323-329.
- ZHU H, GUO YX, DU XP, LI Z, SU L, QIN C. Metabolic analysis of human flora-associated mice with coronary heart disease using liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2020, 28(3): 323-329 (in Chinese).
- [10] 朱华, 李卓, 苏磊, 郭亚茜, 杜晓鹏, 袁建松, 秦川. 冠心病病人源肠道菌群小鼠模型的建立及评价[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(6): 716-724.
- ZHU H, LI Z, SU L, GUO YX, DU XP, YUAN JS, QIN C. Establishment and evaluation of a mouse



- model of human gut microbiota transplanted from patients of coronary heart disease[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2019, 27(6): 716-724 (in Chinese).
- [11] FAITH JJ, REY FE, O'DONNELL D, KARLSSON M, McNULTY NP, KALLSTROM G, GOODMAN AL, GORDON JI. Creating and characterizing communities of human gut microbes in gnotobiotic mice[J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(9): 1094-1098.
- [12] WANG M, DONOVAN SM. Human microbiota-associated swine: current progress and future opportunities[J]. *ILAR Journal*, 2015, 56(1): 63-73.
- [13] MARTÍN R, BERMÚDEZ-HUMARÁN LG, LANGELLA P. Gnotobiotic rodents: an *in vivo* model for the study of microbe-microbe interactions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 409.
- [14] YI P, LI LJ. The germfree murine animal: an important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 157(1/2): 1-7.
- [15] SMITH K, MCCOY KD, MACPHERSON AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota[J]. *Seminars in Immunology*, 2007, 19(2): 59-69.
- [16] BHATTARAI Y, KASHYAP PC. Germ-free mice model for studying host-microbial interactions[J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2016, 1438: 123-135.
- [17] EBERL C, RING D, MÜNCH PC, BEUTLER M, BASIC M, SLACK EC, SCHWARZER M, SRUTKOVA D, LANGE AN, FRICK JS, BLEICH A, STECHER B. Reproducible colonization of germ-free mice with the oligo-mouse-microbiota in different animal facilities[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 2999.
- [18] QV L, YANG ZG, YAO MF, MAO SB, LI YJ, ZHANG J, LI LJ. Methods for establishment and maintenance of germ-free rat models[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1148.
- [19] JIA PP, JUNAID M, WEN PP, YANG YF, LI WG, YANG XG, PEI DS. Role of germ-free animal models in understanding interactions of gut microbiota to host and environmental health: a special reference to zebrafish[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 279: 116925.
- [20] NANCE FC, CAIN JL. Studies of hemorrhagic pancreatitis in germ-free dogs[J]. *Gastroenterology*, 1968, 55(3): 368-374.
- [21] FURUSE M, OKUMURA JI. Nutritional and physiological characteristics in germ-free chickens[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1994, 109(3): 547-556.
- [22] HARDING JCS, ELLIS JA, MCLNTOSH KA, KRAKOWKA S. Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 145(3/4): 209-219.
- [23] NICKLAS W, BANEUX P, BOOT R, DECELLE T, DEENY AA, FUMANELLI M, ILLGEN-WILCKE B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units[J]. *Laboratory Animals*, 2002, 36(1): 20-42.
- [24] AL-ASMAKH M, ZADJALI F. Use of germ-free animal models in microbiota-related research[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(10): 1583-1588.
- [25] QI HB, WEI JM, GAO YH, YANG YZ, LI YY, ZHU H, SU L, SU XM, ZHANG Y, YANG RC. Reg4 and complement factor D prevent the overgrowth of *E. coli* in the mouse gut[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 483.
- [26] SCHÉLE E, GRAHNEMO L, ANESTEN F, HALLÉN A, BÄCKHED F, JANSSON JO. The gut microbiota reduces leptin sensitivity and the expression of the obesity-suppressing neuropeptides proglucagon (gcg) and brain-derived neurotrophic factor (bdnf) in the central nervous system[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(10): 3643-3651.
- [27] TURTON MD, O'SHEA D, GUNN I, BEAK SA, EDWARDS CMB, MEERAN K, CHOI SJ, TAYLOR GM, HEATH MM, LAMBERT PD, WILDING JPH, SMITH DM, GHATEI MA, HERBERT J, BLOOM SR. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding[J]. *Nature*, 1996, 379(6560): 69-72.
- [28] HANSEN AK, HANSEN CHF, KRYCH L, NIELSEN DS. Impact of the gut microbiota on rodent models of human disease[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(47): 17727-17736.
- [29] FICARA M, PIETRELLA E, SPADA C, DELLA CASA MUTTINI E, LUCACCIONI L, IUGHETTI L, BERARDI A. Changes of intestinal microbiota in early life[J]. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine: the Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of*

- Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians, 2020, 33(6): 1036-1043.
- [30] TEIXEIRA TFS, SOUZA NCS, CHIARELLO PG, FRANCESCHINI SCC, BRESSAN J, FERREIRA CLLF, DO CARMO G PELUZIO M. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors[J]. *Clinical Nutrition*, 2012, 31(5): 735-740.
- [31] WOSTMANN BS, LARKIN C, MORIARTY A, BRUCKNER-KARDOSS E. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats[J]. *Laboratory Animal Science*, 1983, 33(1): 46-50.
- [32] BÄCKHED F, DING H, WANG T, HOOPER LV, KOH GY, NAGY A, SEMENKOVICH CF, GORDON JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(44): 15718-15723.
- [33] FLEISSNER CK, HUEBEL N, ABD EL-BARY MM, LOH G, KLAUS S, BLAUT M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity[J]. *British Journal of Nutrition*, 2010, 104(6): 919-929.
- [34] JACOUTON E, MACH N, CADIOU J, LAPAQUE N, CLÉMENT K, DORÉ J, van HYLCKAMA VLIÉG JET, SMOKVINA T, BLOTTIÈRE HM. *Lactobacillus rhamnosus* CNCMI-4317 modulates fiaf/Angptl4 in intestinal epithelial cells and circulating level in mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0138880.
- [35] AOKI R, ONUKI M, HATTORI K, ITO M, YAMADA T, KAMIKADO K, KIM YG, NAKAMOTO N, KIMURA I, CLARKE JM, KANAI T, HASE K. Commensal microbe-derived acetate suppresses NAFLD/NASH development via hepatic FFAR2 signalling in mice[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 188.
- [36] MARTINS F, CAMPOS DHS, PAGAN LU, MARTINEZ PF, OKOSHI K, OKOSHI MP, PADOVANI CR, de SOUZA AS, CICOGNA AC, de OLIVEIRA SA. High-fat diet promotes cardiac remodeling in an experimental model of obesity[J]. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, 2015, 105(5): 479-486.
- [37] KHAN N, MUKHTAR H. Tea polyphenols for health promotion[J]. *Life Sciences*, 2007, 81(7): 519-533.
- [38] CHENG J, PALVA AM, de VOS WM, SATOKARI R. Contribution of the intestinal microbiota to human health: from birth to 100 years of age[M]// *Between Pathogenicity and Commensalism*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011: 323-346.
- [39] THEVARANJAN N, PUCHTA A, SCHULZ C, NAIDOO A, SZAMOSI JC, VERSCHOOR CP, LOUKOV D, SCHENCK LP, JURY J, FOLEY KP, SCHERTZER JD, LARCHÉ MJ, DAVIDSON DJ, VERDÚ EF, SURETTE MG, BOWDISH DME. Age-associated microbial dysbiosis promotes intestinal permeability, systemic inflammation, and macrophage dysfunction[J]. *Cell Host & Microbe*, 2017, 21(4): 455-466.e4.
- [40] PENG X, CHENG L, YOU Y, TANG CW, REN B, LI YQ, XU X, ZHOU XD. Oral microbiota in human systematic diseases[J]. *International Journal of Oral Science*, 2022, 14: 14.
- [41] BAVANI NG, HAJHASHEMY Z, SANEEI P, KESHTELI AH, ESMAILLADEH A, ADIBI P. The relationship between meal regularity with irritable bowel syndrome (IBS) in adults[J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2022, 76(9): 1315-1322.
- [42] CELEBI SOZENER Z, OZDEL OZTURK B, CERCİ P, TURK M, GORGULU AKIN B, AKDIS M, ALTINER S, OZBEY U, OGULUR I, MITAMURA Y, YILMAZ I, NADEAU K, OZDEMİR C, MUNGAN D, AKDIS CA. Epithelial barrier hypothesis: effect of the external exposome on the microbiome and epithelial barriers in allergic disease[J]. *Allergy*, 2022, 77(5): 1418-1449.
- [43] UWISHEMA O, MAHMOUD A, SUN J, CORREIA IFS, BEJJANI N, ALWAN M, NICHOLAS A, OLUYEMISI A, DOST B. Is Alzheimer's disease an infectious neurological disease? A review of the literature[J]. *Brain and Behavior*, 2022, 12(8): e2728.
- [44] PATTERSON E, RYAN PM, CRYAN JF, DINAN TG, ROSS RP, FITZGERALD GF, STANTON C. Gut microbiota, obesity and diabetes[J]. *Postgraduate Medical Journal*, 2016, 92(1087): 286-300.
- [45] JÄRBRINK-SEHGAL E, ANDREASSON A. The gut microbiota and mental health in adults[J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2020, 62: 102-114.
- [46] SUN PL, ZHU H, LI X, SHI WX, GUO YX, DU XP, ZHANG L, SU L, QIN C. Comparative metagenomics and metabolomes reveals abnormal metabolism activity is associated with gut microbiota in alzheimer's disease mice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 11560.
- [47] O'LEARY OF, CRYAN JF. A ventral view on antidepressant action: roles for adult hippocampal

- neurogenesis along the dorsoventral axis[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2014, 35(12): 675-687.
- [48] LAKHAN SE, CARO M, HADZIMICHALIS N. NMDA receptor activity in neuropsychiatric disorders[J]. Frontiers in Psychiatry, 2013, 4: 52.
- [49] DENG YY, ZHOU MF, WANG JF, YAO JX, YU J, LIU WW, WU LL, WANG J, GAO R. Involvement of the microbiota-gut-brain axis in chronic restraint stress: disturbances of the kynurenine metabolic pathway in both the gut and brain[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1-16.
- [50] KIM J, KIM DW, LEE A, MASON M, JOUROUKHIN Y, WOO H, YOLKEN RH, PLETNIKOV MV. Homeostatic regulation of neuronal excitability by probiotics in male germ-free mice[J]. Journal of Neuroscience Research, 2022, 100(2): 444-460.
- [51] HSIAO EY, McBRIDE SW, HSIEN S, SHARON G, HYDE ER, MCCUE T, CODELLI JA, CHOW J, REISMAN SE, PETROSINO JF, PATTERSON PH, MAZMANIAN SK. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders[J]. Cell, 2013, 155(7): 1451-1463.
- [52] 朱华, 郭亚茜, 杜晓鹏, 李卓, 秦川. 无菌 APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 双转基因小鼠模型建立及脑内斑块变化初步观察[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 521-526.
- ZHU H, GUO YX, DU XP, LI Z, QIN C. Establishment of germ free APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 transgenic mice and changes of amyloid plaques in the brain[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2019, 27(4): 521-526 (in Chinese).
- [53] ERNY D, LENA HRABĚ de ANGELIS A, JAITIN D, WIEGHOFER P, STASZEWSKI O, DAVID E, KEREN-SHAUL H, MAHLAKOIV T, JAKOBESHAGEN K, BUCH T, SCHWIERZECK V, UTERMÖHLEN O, CHUN E, GARRETT WS, MCCOY KD, DIEFENBACH A, STAEHELI P, STECHER B, AMIT I, PRINZ M. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS[J]. Nature Neuroscience, 2015, 18(7): 965-977.
- [54] KHOSRAVI Y, SEOW SW, AMOYO AA, CHIOU KH, TAN TL, WONG WY, POH QH, DOLI SENTOSA IM, BUNTE RM, PETERSSON S, LOKE MF, VADIVELU J. *Helicobacter pylori* infection can affect energy modulating hormones and body weight in germ free mice[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8731.
- [55] ACURCIO LB, SANDES SHC, BASTOS RW, SANT'ANNA FM, PEDROSO SHSP, REIS DC, NUNES AC, CASSALI GD, SOUZA MR, NICOLI JR. Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infection[J]. Beneficial Microbes, 2017, 8(4): 579-588.
- [56] PARK YJ, KANG BH, KIM HJ, OH JE, LEE HK. A microbiota-dependent subset of skin macrophages protects against cutaneous bacterial infection[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 799598.
- [57] PEÑA-GIL N, SANTISO-BELLÓN C, GOZALBO-ROVIRA R, BUESA J, MONEDERO V, RODRÍGUEZ-DÍAZ J. The role of host glycobiology and gut microbiota in *Rotavirus* and *Norovirus* infection, an update[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(24): 13473.
- [58] YU P, GAO ZF, ZONG YY, BAO LL, XU LL, DENG W, LI FD, LV Q, GAO ZC, XU YF, YAO YF, QIN C. Histopathological features and distribution of EV71 antigens and SCARB2 in human fatal cases and a mouse model of enterovirus 71 infection[J]. Virus Research, 2014, 189: 121-132.