

性激素变化对小鼠肠道菌群构成的影响

封暖暖 杨鹏程[#] 谭荣曾 赵浩汐 张晨曦

蒋元琳 韩香雨 胡德夫 刘树强^{*}

北京林业大学生态与自然保护学院 北京 100091

摘要: 肠道菌群在维持宿主免疫和消化系统功能方面发挥着重要作用, 肠道菌群的多样性和丰富度是衡量宿主健康状况的重要生理指标。性激素对动物生长发育发挥重要作用, 但其对肠道菌群构成影响的相关实验研究相对较少。本研究以模式生物小鼠 (*Mus musculus*) 为对象, 探究性激素的变化对小鼠肠道菌群构成的影响。采用外科手术方式建立小鼠去势模型, 通过 16S rRNA 高通量测序技术, 研究性激素对小鼠肠道菌群构成的影响。研究结果表明, 雌性小鼠和雄性小鼠去势后, 性激素水平显著下降。肠道菌群在门水平上, 正常小鼠和去势小鼠肠道细菌群落均由拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、埃普西隆杆菌门 (Epsilonbacteraeota)、髌骨细菌门 (Patescibacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、软壁菌门 (Tenericutes)、脱铁杆菌门 (Deferribacteres)、酸杆菌门 (Acidobacteria) 和蓝藻细菌门 (Cyanobacteria) 组成, 主要菌群为厚壁菌门和拟杆菌门物种, 两门占物种相对丰度百分比达 80% 以上。Alpha 多样性计算结果表明, 雌性小鼠与雄性小鼠的正常组与去势对照组间的微生物区系均匀度无显著差异, Beta 多样性结果进一步表明, 正常组与去势组之间微生物区系结构无显著差异。由上述结果可以得到结论, 性激素变化没有引起小鼠肠道菌群构成的差异。

关键词: 小鼠; 性激素; 肠道菌群

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2023) 02-263-14

Effects of the Changes of Sex Hormones on Gut Microbiota Composition of Experimental Mice

FENG Nuan-Nuan YANG Peng-Cheng[#] TAN Rong-Zeng ZHAO Hao-Xi
ZHANG Chen-Xi JIANG Yuan-Lin HAN Xiang-Yu HU De-Fu LIU Shu-Qiang^{*}

College of Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100091, China

Abstract: [Objectives] Gut microbiota plays an important role in immune function and gastrointestinal system. The diversity and richness of gut microbiota are important physiological index to measure host health. Sex hormones play an important role on the growth and development of animals, but the effect of sex

基金项目 北京林业大学大学生创新创业训练计划项目 (No. X202110022211), 北京市自然科学基金项目 (No. 5202016);

***** 通讯作者, E-mail: liushuqiang@bjfu.edu.cn;

第一作者介绍 封暖暖, 女, 硕士研究生; 研究方向: 野生动植物保护与利用; E-mail: fnn19990123@163.com;

共同第一作者 杨鹏程, 男, 硕士研究生; 研究方向: 野生动植物保护与利用; E-mail: yxsdyx18@bjfu.edu.cn.

收稿日期: 2022-03-22, 修回日期: 2022-11-07 DOI: 10.13859/j.cjz.202302010

hormones on gut microbiota composition is not clear. **[Methods]** In this study, a mouse (*Mus musculus*) castration model was established by surgical method, fresh fecal samples of mice were continuously observed and collected during feeding, and the effects of sex hormones on the intestinal flora of mice were studied by 16S rRNA high-throughput sequencing technology. Usearch was applied to cluster reads with similarity above 97.0% and generate OTUs. Taxonomic annotations of feature sequences were processed by Bayesian classifier using SILVA as reference database. Statistics on composition in each sample were calculated at level of phylum, class, order, family, genus and species. QIIME was applied to obtain abundance of each species in samples, and distribution histogram at each taxonomic level were generated by certain R package. Alpha diversity metrics were evaluated by QIIME2. Beta diversity analysis was processed by QIIME. Blood was collected from the mice after they were fed for one month. The contents of estradiol and testosterone in serum of mice were determined by radioimmunoassay (RIA). **[Results]** Sex hormone levels in female and male mice decreased significantly after ovulation (Table 1). At phylum level, the intestinal bacterial communities of both normal mice and castrated mice were composed of Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Epsilonbacteraeota, Patensibacteria, Actinobacteria, Tenericutes, Deferribacteres, Acidobacteria and Cyanobacteria (Fig. 4). The populations of major bacteria found in normal and castrated mice were similar, with Firmicutes and Bacteroides as the dominant flora, and the sum of relative abundance percentages of the two flora was more than 80% (Table 4). Alpha diversity showed no significant difference in microflora evenness between the normal group and the castrated group (Table 5). Beta diversity showed no significant difference in microflora structure between the normal group and the castrated group. Followings are Beta diversity analysis based on four distance matrices: PCA analysis; PERMANOVA analysis and UPGMA analysis (Fig. 8). **[Conclusion]** The change of sex hormones did not cause the difference in the composition of the intestinal flora of mice.

Key words: Mice; Sex hormones; Gut microbiota composition

性激素是动物体内对动物生长繁育发挥重要作用的激素，雌性动物性激素主要为卵巢分泌的雌二醇（estradiol, E2），雄性动物性激素主要由睾丸分泌的睾酮（testosterone, T）。雌激素和雄激素在动物体内各组织细胞中主要通过结合细胞核内雌激素受体（estrogen receptor, ER）及雄激素受体（androgen receptor, AR）启动基因转录发挥调控作用（Georget et al. 2002, Reebye et al. 2012）。性激素对于维持动物第二性征（邵凡等 2013）、泌尿生殖系统（Castoria et al. 2004）、心血管系统（赵启群等 2008）及骨骼系统（Ferrando et al. 2002, Kadi 2008）等全身生理功能都具有重要作用。

性激素变化对肠道菌群构成的影响还不十分清楚，目前缺少系统的实验研究。动物肠道

是食物营养消化吸收的部位，肠道微生物在食物代谢和肠道生理等方面发挥重要作用，具有提供动物必需的营养（聂小燕等 2022）、促进动物生长及发育等（吴敏等 2019）功能，肠道微生物的改变可影响机体生理及免疫功能（朱丽慧等 2018）。性激素和肠道菌群都是动物机体的重要部分，近年来的多项研究发现，性别或性类固醇会影响人类和啮齿类动物肠道细菌的组成（袁欣等 2020）。

为了研究性激素变化对小鼠（*Mus musculus*）肠道菌群构成的影响，本研究通过外科手术方法建立了雌性小鼠和雄性小鼠去势模型，应用 16S rRNA 高通量测序技术对去势小鼠粪便菌群构成进行了分析，系统全面地分析了去势后小鼠肠道微生物菌群构成变化，从而探究性激

素对小鼠肠道菌群构成的影响, 为进一步了解性激素对肠道菌群的作用提供基础数据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物及分组

成年健康 SPF 级昆明白小鼠 16 只 (8 雌, 8 雄), 年龄均为 8 周龄, 体重约为 30 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。小鼠自由饮水和进食, 分别单独饲养于北京林业大学动物房, 在饲喂第 13 天时对去势组进行去势手术。8 只雌性小鼠分成雌性正常组 (normal female, NF)、雌性去势组 (castrated female, CF), 8 只雄性小鼠分成雄性正常组 (normal male, NM) 及雄性去势组 (castrated male, CM), 共计 4 组, 每组 4 只。雌性正常组 4 只小鼠的编号为 NF1 ~ NF4, 其余组别依此类推。在小鼠饲养第 26 天, 即术后第 13 天时, 正常雄性组 1 只小鼠不明原因死亡, 解剖没有发现异常, 因此雄性正常组小鼠最终为 3 只。所有动物实验操作均符合国家实验动物福利伦理的相关规定, 并经过北京林业大学动物伦理委员会审核 (审批号: EAWC_BJFU_2022017)。

1.2 实验方法

1.2.1 去势和术后护理 小鼠在鼠笼中饲养 13 d, 进行去势手术。

小鼠去势方法: 去势组雌性小鼠肌肉注射赛拉嗪 1 mg/kg 麻醉, 将小鼠仰卧位固定, 剪去腹中下部被毛, 采用碘伏消毒后在腰背部两侧 0.5 cm 处, 做长约 0.5 cm 的纵行切口, 剪开皮肤和肌肉, 打开腹腔, 以无齿镊探入腹腔, 拉拽出卵巢及带有的脂肪组织, 手术线结扎, 将卵巢全部及周边的脂肪组织切除, 将其他组织放回腹腔, 分别缝合肌肉层和皮肤, 并用医用碘酒对切口消毒, 小鼠苏醒后放回笼内。对照组雌性小鼠剪开同样部位, 但不摘除其组织, 后同样缝合。

去势组雄性小鼠利用同样的处理方式麻醉及打开腹腔后, 以无齿镊探入腹腔, 拉拽出睾丸及带有的脂肪组织, 手术线结扎连接睾丸的

血管, 将睾丸、附睾全部及周边的脂肪组织切除; 将其他组织放回腹腔, 分别缝合肌肉层和皮肤, 并用医用碘酒对切口消毒, 小鼠苏醒后放回笼中。对照组雄性小鼠剪开同样部位, 但不摘除睾丸组织, 后同样缝合。

术后护理: 每天在小鼠伤口部分涂抹碘伏, 持续 3 d, 防止感染, 正常喂食及饮水。

1.2.2 小鼠粪便样品的采集 将所有实验小鼠转移到干净的鼠笼饲养, 饲养第 54 天, 即术后第 41 天采集小鼠新鲜粪便样本。采集样本时使用无菌镊子以避免污染。采集后立即将样品储存在无菌离心管中密封, 以避免样品之间的交叉污染。所有新鲜粪便样本储存在液氮中带回实验室, 将其储存在 -80 °C 冰箱中直到提取 DNA。

1.2.3 小鼠血清中的性激素检测 在实验小鼠采集粪便 1 个月后, 使用眼球采血法采集小鼠血液 1 ml, 3 000 r/min 离心 15 min。吸取上清 0.4 ml 于新的离心管中。将样品送至北京北方生物技术研究所, 采用放射免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA) 测定小鼠血清中激素含量。使用雌二醇测定试剂盒 (酶联免疫法, 北京北方生物技术研究所有限公司) 及睾酮测定试剂盒 (酶联免疫法, 北京北方生物技术研究所有限公司) 测定小鼠血清中雌二醇及睾酮含量。在固相二抗中加入待测血清、辣根过氧化物酶标记激素以及抗激素抗体, 使之形成包被二抗-抗激素抗体-激素复合物, 经显色后在酶标仪测定吸光值 (optical density, OD), 利用拟合浓度-吸光度曲线, 反算出待测血清中的激素含量。

1.2.4 DNA 的提取和纯化 使用 QIAamp DNA 粪便迷你试剂盒 (德国希尔登 QIAGEN) 提取粪便总 DNA。通过在含有溴化乙锭的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 检测核酸的完整性。DNA 样本使用 qubit 2.0 荧光计 (state of california carlsbad invitrogen) 进行定量。提取的总 DNA 保存在 -80 °C 冰箱中。干冰条件下送往北京百迈客生物科技有限公司对样品进行 PCR 扩增及测序。针对细菌的 16S rRNA 基因 V3 ~ V4 区合成特

异引物,正向引物 5'-ACT CCT ACG GGG AGG AGC A-3',反向引物 3'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-5' (简并碱基 H 为 A/T/C, V 为 A/C/G, W 为 A/T)。使用引物进行 PCR 扩增,对扩增产物进行纯化、定量和均一化形成测序文库。质检合格的文库用 Illumina Novaseq 6000 进行测序得到 Raw Reads,使用 Trimmomatic v0.33 软件对测序得到的 Raw Reads 进行过滤;然后使用 cutadapt 1.9.1 软件进行引物序列的识别与去除,得到不包含引物序列的 Clean Reads;使用 Usearch v10 软件,通过 overlap 对每个样品的 Clean Reads 进行拼接,然后根据不同区域的长度范围对拼接后数据进行长度过滤;使用 UCHIME v4.2 软件,鉴定并去除嵌合体序列,得到最终有效数据 (effective reads)。

1.3 数据分析

小鼠血清中的性激素检测分析和小鼠粪便样品肠道菌群数据应用 SPSS PRO 处理,组间差异比较采用独立样本 *t* 检验,实验数据以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示。 $P < 0.01$ 代表极显著差异, $P < 0.05$ 代表显著差异。

QIIME 数据分析软件包用于 16S rRNA 数据分析。根据条形码将正向和反向读取连接起来并分配给样本,通过切断条形码和引物序列进行质量过滤。使用 UCHIME 算法将经筛选合格后的序列与参考数据库核糖体数据库项目 (ribosomal database project, RDP, <http://www.arb-silva.de/>, 版本号 138.1) 进行比对,以检测并去除嵌合序列,得到有效序列。使用 USEARCH (version 10.0) 软件在 97.0% 的相似水平上对 Reads 有效序列进行聚类,默认以测序所有序列数的 0.005% 作为阈值过滤获得操作分类单元 (operational taxonomic, OTU)。基于核糖体数据库项目进行比对,在置信阈值为 0.8 的情况下为所有 OTU 分配分类类别。用稀释曲线验证测序数据量是否足以反映样品中的物种多样性。

使用 QIIME2 软件对各个样品的 Alpha 多样性指数进行评估,常用的度量菌群丰度的指

标有 Chao1 丰富度估计量 (Chao1 richness estimator)、ACE 丰富度估计量 (ACE richness estimator);度量菌群多样性的指标有香农-威纳多样性指数 (Shannon-Wiener diversity index)、辛普森多样性指数 (Simpson diversity index)、系统发育多样性指数 (phylogenetic diversity)。使用 QIIME 软件进行 Beta 多样性 (beta diversity) 分析,比较不同样品在物种多样性方面的相似程度。使用线性判别分析 [linear discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe] 来分析寻找有差异的生物标识。

2 结果

2.1 去势和正常小鼠性激素比较分析

去势雌性小鼠组 (CF) 与正常雌性小鼠组 (NF) 相比,雌二醇水平显著降低 ($t = 4.790$, $P < 0.05$);去势雄性小鼠组 (CM) 与正常雄性组 (NM) 小鼠相比,睾酮水平显著降低 ($t = 4.939$, $P < 0.05$) (表 1)

表 1 小鼠性激素水平检测结果

Table 1 Sex hormones results of mouse

	雌性 Female	雄性 Male
	雌二醇 Estradiol (ng/L)	睾酮 Testosterone (μg/L)
正常组 Normal group	57.65 51.59 55.92 51.35	17.889 24.635 13.107 —
平均值 Average	54.13	18.540
去势组 Castrated group	33.15 35.51 40.32 53.72	1.499 1.480 1.800 —
平均值 Average	40.68	1.590
<i>t</i> 值 <i>t</i> value	4.790	4.939
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.041	0.039

雌性去势组去除 1 离群值 53.72 ng/L,使用剩余 3 组数据进行计算;正常雄性组 1 只小鼠不明原因死亡,1 去势雄性样品检测不合格,此样品结果用“—”表示,使用剩余 3 组数据进行计算。

The outlier value 53.72 ng/L in CF was removed. The data of dead mouse in NM and unqualified sample in CM were removed, the remaining three sets of data were used for calculations.

2.2 肠道菌群测序数据质量评估

对 4 组小鼠共 15 份粪便样品 16S rRNA 基因进行测序, 15 个样品测序后共获得 1 200 029 对 Raw Reads, 经双端 Reads 拼接、过滤后共产生 1 196 042 条 Clean Reads。每个样品至少产生 79 282 条 Clean Reads, 平均产生 79 736 条 Clean Reads (表 2)。

小鼠菌群稀释性曲线均趋于平坦, 说明目前样本测序数据量渐进合理, 即使增加数据量也只会产生少量新的物种 (图 1)。

2.3 操作分类单元聚类分析

基于有效数据进行分析, 共得到 7 757 个操作分类单元 (OTU), 利用 OTU 序列进行物种注释, 结果显示共有 595 个 OTU 注释到物种 (图 2)。基于 OTU 的 Venn 图显示雌性正常组 (NF) 与去势组 (CF) 之间共同含有的菌群数目为 581 (图 3a), 雄性正常组 (NM) 与去势组 (CM) 之间所共同含有的菌群数目为 567 (图 3b), 结果表明, 不管是雌性还是雄性, 正

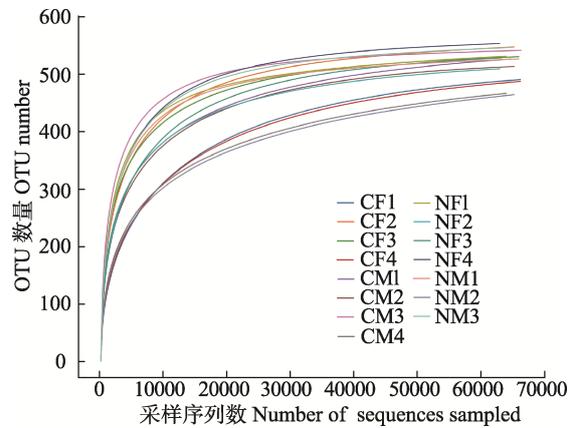


图 1 小鼠肠道菌群多样本稀释曲线

Fig. 1 Multy samples rarefaction curves of gut microbiota in Mouse

常个体与去势个体肠道菌群的种类基本一致。

2.4 小鼠肠道菌群物种注释及组间差异物种分析

2.4.1 物种注释聚类结果 注释到物种的 595 个 OTU 菌类均分属 16 门 26 纲 50 目 80 科 178

表 2 小鼠样品测序数据处理结果

Table 2 Summary on raw data processing

样品名称 Sample ID	原始序列数 Raw reads	高质量序列数 Clean reads	有效序列数 Effective reads	样品平均序列长度 Average length (bp)	GC 含量 GC content (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	有效序列比例 Effective reads ratio (%)
NF1	80 377	80 129	76 453	414	53.25	99.16	96.49	95.12
NF2	79 779	79 525	76 265	416	52.82	99.13	96.38	95.60
NF3	79 864	79 612	77 512	420	53.33	99.10	96.27	97.05
NF4	80 437	80 168	78 337	420	53.91	99.08	96.21	97.39
CF1	80 307	80 022	76 478	424	53.38	99.00	96.0	95.23
CF2	80 013	79 759	77 305	419	53.51	99.10	96.31	96.62
CF3	80 002	79 743	77 367	416	53.53	99.11	96.36	96.71
CF4	79 874	79 654	77 482	423	53.61	99.05	96.14	97.01
NM1	79 866	79 587	77 665	416	53.76	99.09	96.27	97.24
NM2	80 024	79 738	77 838	421	54.40	98.96	95.90	97.27
NM3	79 703	79 451	77 075	418	52.98	99.11	96.33	96.70
CM1	79 948	79 686	76 705	419	53.33	99.09	96.23	95.94
CM2	80 015	79 727	77 411	420	54.27	99.03	96.10	96.75
CM3	80 257	79 959	77 718	415	53.42	99.12	96.36	96.84
CM4	79 563	79 282	76 596	423	53.62	99.09	96.23	96.27

CF. 雌性去势组; CM. 雄性去势组; NF. 雌性正常组; NM. 雄性正常组; Q20. 质量值大于等于 20 的碱基占总碱基数的百分比; Q30. 质量值大于等于 30 的碱基占总碱基数的百分比。

CF. Female castrated mice; CM. Male castrated mice; NF. Female normal mice; NM. Male normal mice; Q20. Percentage of base with mass value greater than or equal to 20 in total base. Q30. Percentage of bases with mass value greater than or equal to 30 in total bases.

属 195 种 (表 3)。

2.4.2 门 (Phylum) 水平分析肠道菌群差异
正常组与去势组小鼠肠道菌群在门水平上最大丰度排名前 10 的物种为拟杆菌门

(Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、埃普西隆杆菌门 (Epsilonbacteraeota)、龛骨细菌门 (Patescibacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、

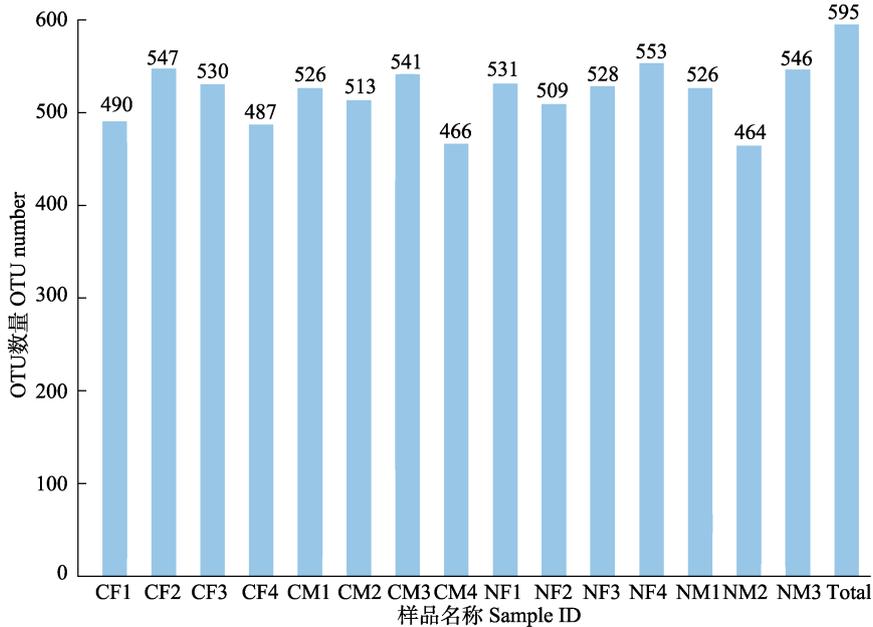


图 2 小鼠粪便样品 OTU 聚类结果

Fig. 2 OTU clustering results of mouse stool samples

CF. 雌性去势组; CM. 雄性去势组; NF. 雌性正常组; NM. 雄性正常组。

CF. Female castrated mice; CM. Male castrated mice; NF. Female normal mice; NM. Male normal mice.

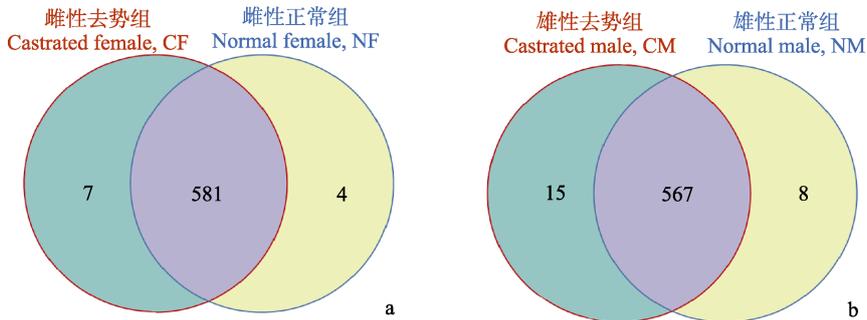


图 3 小鼠肠道菌群 OTU 的 Venn 图

Fig. 3 Venn diagram of OTU of gut microbiota composition in mice

a. 雌性正常组 (NF) 与去势组 (CF) 共有的 OTU 数量的 Venn 图; b. 雄性正常组 (NM) 与去势组 (CM) 共有的 OTU 数量的 Venn 图。

a. Venn diagram based on group of females in normal mice (NF) and castrated mice (CF); b. Venn diagram based on group of males in normal mice (NM) and castrated mice (CM).

表 3 样品各等级物种统计表

Table 3 Statistics of species annotation

样本名称 Sample	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species
NF1	16	26	50	79	173	190
NF2	16	26	49	77	166	182
NF3	16	26	49	79	172	186
NF4	16	26	50	80	176	192
CF1	16	26	50	79	170	186
CF2	16	26	50	79	173	188
CF3	16	26	48	77	170	183
CF4	15	25	48	77	161	177
NM1	16	26	49	79	172	187
NM2	16	26	47	73	154	170
NM3	16	26	49	79	173	189
CM1	16	26	47	77	168	182
CM2	16	26	50	80	170	187
CM3	16	26	50	79	173	190
CM4	16	26	47	77	160	173
总计 Total	16	26	50	80	178	195

CF. 雌性去势组; CM. 雄性去势组; NF. 雌性正常组; NM. 雄性正常组。

CF. Female castrated mice; CM. Male castrated mice; NF. Female normal mice; NM. Male normal mice.

软壁菌门 (Tenericutes)、脱铁杆菌门 (Deferribacteres)、酸杆菌门 (Acidobacteria) 和蓝藻细菌门 (Cyanobacteria)。依据物种相对丰度显示, 去势组和正常组构成主要由拟杆菌门及厚壁菌门 2 个菌门为主, 所占比例均在 80% 以上 (图 4)。放线菌门及变形菌门等门类则占比较低。在门水平, 雌性正常组肠道菌群前 10 位中所有门的物种丰度与去势组无显著差异 ($P > 0.05$), 雄性正常组肠道菌群前 10 位所有门的丰度与去势组无显著差异 ($P > 0.05$) (表 4)。

雌性正常组和去势组及雄性正常组和去势组小鼠肠道菌群在门水平的种群热图聚类显示, 在纵向聚类、即物种聚类中, 雌性组的正常组和去势组的 8 只个体未分成明显两支, 说明正常组和去势组检测到的肠道菌群在个体间的丰度较为相似; 雄性组的正常组和去势组的 7 只个体也未分成明显两支, 表明不同种类的肠道菌群在正常与去势雄性个体间的丰度也具有较高的相似性 (图 5)。

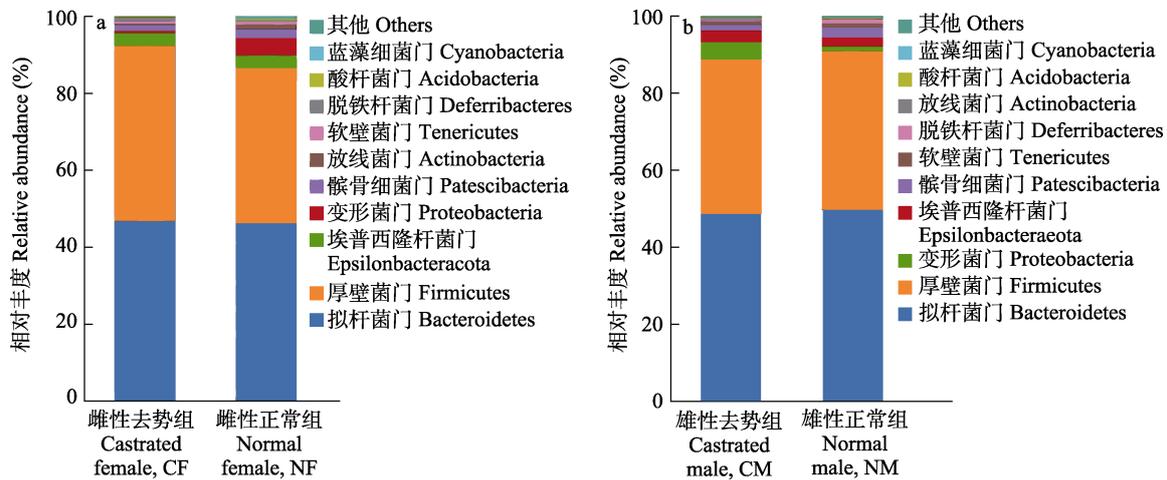


图 4 小鼠肠道菌群物种相对丰度柱状图

Fig. 4 Species distribution of the gut microbiota in all samples

a. 雌性正常组 (NF) 与去势组 (CF) 小鼠肠道菌群物种相对丰度柱状图; b. 雄性正常组 (NM) 与去势组 (CM) 小鼠肠道菌群物种相对丰度柱状图。

a. Species distribution of the gut microbiota of females in normal mice (NF) and castrated mice (CF); b. Species distribution of the gut microbiota of males in normal mice (NM) and castrated mice (CM).

表 4 门水平丰度对照统计表 (平均值 ± 标准差)

Table 4 Comparative statistical table of phylum horizontal abundance (Mean ± SD)

门 Phylum	雌性 Female		校正 P 值 P-corrected	雄性 Male		校正 P 值 P-corrected
	正常组 Normal (NF)	去势组 Castrated (CF)		正常组 Normal (NM)	去势组 Castrated (CM)	
拟杆菌门 Bacteroidetes	0.464 3 ± 0.185 8	0.468 1 ± 0.117 9	1.066 7	0.497 3 ± 0.122 2	0.487 0 ± 0.137 6	1.066 7
厚壁菌门 Firmicutes	0.401 2 ± 0.134 6	0.454 8 ± 0.097 9	0.618 4	0.411 3 ± 0.111 4	0.399 5 ± 0.097 2	1.000 0
变形菌门 Proteobacteria	0.032 4 ± 0.018 4	0.032 7 ± 0.024 4	1.000 0	0.022 4 ± 0.007 1	0.029 5 ± 0.014 8	0.462 2
埃普西隆杆菌门 Epsilonbacteraeota	0.045 4 ± 0.038 0	0.006 5 ± 0.002 6	0.167 4	0.011 9 ± 0.010 1	0.045 4 ± 0.033 5	0.411 2
髌骨细菌门 Patescibacteria	0.023 7 ± 0.017 3	0.014 1 ± 0.009 0	0.515 3	0.026 6 ± 0.002 8	0.015 5 ± 0.014 9	0.513 5
软壁菌门 Tenericutes	0.011 2 ± 0.013 6	0.003 8 ± 0.002 8	0.475 7	0.011 5 ± 0.008 7	0.003 3 ± 0.002 9	0.308 4
脱铁杆菌门 Deferribacteres	0.008 1 ± 0.010 0	0.006 8 ± 0.013 0	0.687 1	0.001 0 ± 0.000 2	0.007 1 ± 0.010 6	0.616 8
放线菌门 Actinobacteria	0.003 7 ± 0.001 7	0.009 6 ± 0.004 5	0.397 1	0.001 0 ± 0.003 5	0.008 0 ± 0.005 1	0.697 5
酸杆菌门 Acidobacteria	0.002 5 ± 0.001 0	0.001 3 ± 0.000 4	0.231 0	0.002 2 ± 0.001 3	0.001 3 ± 0.000 9	0.419 5
蓝藻细菌门 Cyanobacteria	0.002 6 ± 0.001 9	0.001 1 ± 0.000 3	0.334 7	0.002 4 ± 0.001 7	0.001 1 ± 0.000 7	0.660 2

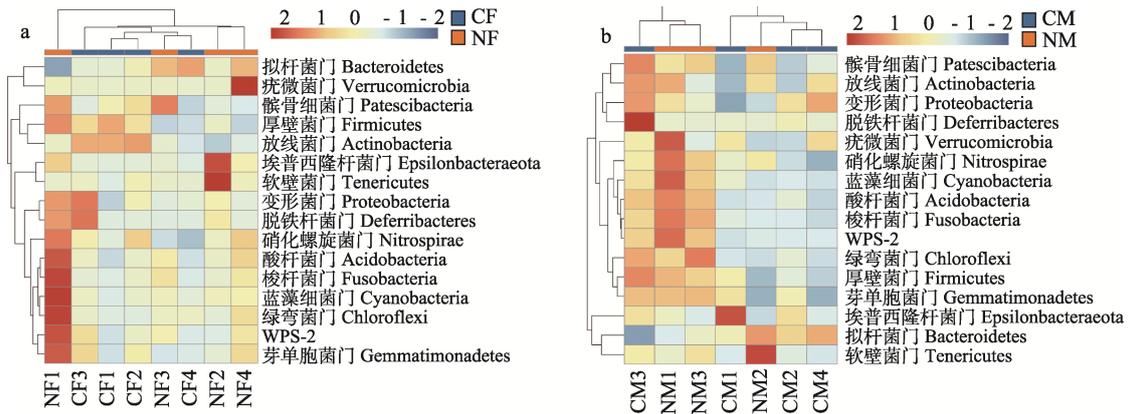


图 5 物种丰度聚类热图

Fig. 5 Heat map of species richness clustering

a. 雌性正常组 (NF) 与去势组 (CF) 小鼠肠道菌群物种丰度聚类热图; b. 雄性正常组 (NM) 与去势组 (CM) 小鼠肠道菌群物种丰度聚类热图。横向聚类为样品信息, 纵向聚类为物种信息; 左侧聚类树为物种聚类树, 上方的聚类树为样品聚类树; 中间为热图。

a. Heat map of species richness of the gut microbiota of females in normal mice (NF) and castrated mice (CF); b. Heat map of species richness of the gut microbiota of males in normal mice (NM) and castrated mice (CM). Horizontal clustering is sample information, while vertical clustering is species information; the left cluster tree is a species cluster tree, the top cluster tree is a sample cluster tree; heat map is in the middle.

2.4.3 小鼠肠道菌群线性判别分析 利用线性判别分析 (LEfSe) 进行组间菌群差异分析, 筛选出了与各组所检出的菌群层级关系中有显著性差异的物种 (图 6, 7)。结果显示, 雌性去势和雌性正常组之间差异物种数量较少 (图

6a), 筛选出埃普西隆杆菌门、Campylobacteria 纲、弯曲菌目 (Campylobacterales)、螺旋杆菌科 (Helicobacteraceae)、螺旋杆菌属 (*Helicobacter*) 和螺旋杆菌属的某一种是发挥重要作用的菌群 (图 7a); 雄性去势和雄性正常组之间也无明

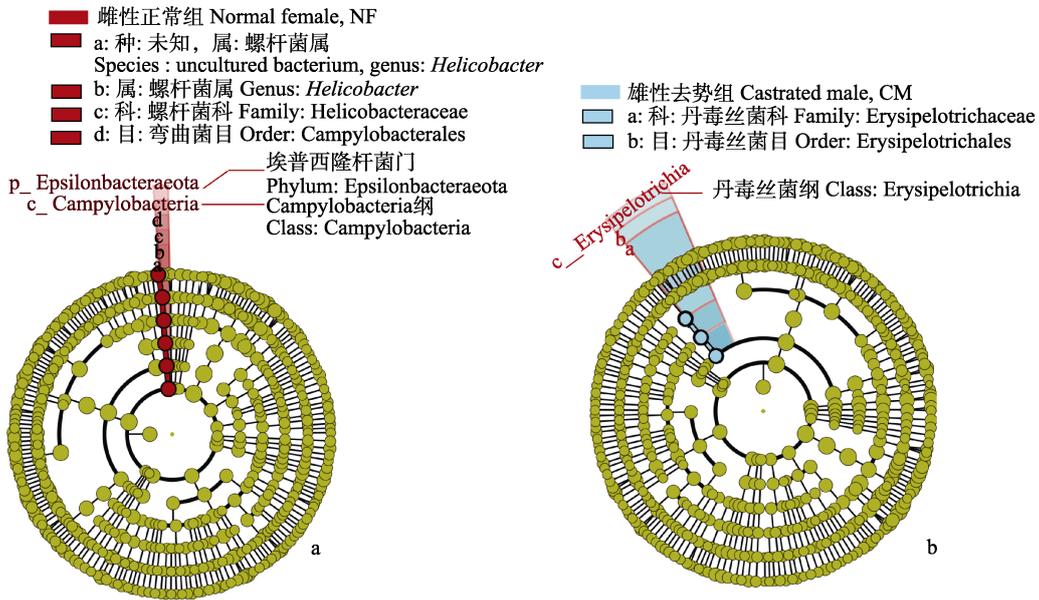


图 6 LefSe 分析进化分支图

Fig. 6 Cladogram based on LefSe analysis

a. 雌性正常组 (NF) 与去势组 (CF) 小鼠肠道菌群物种 LefSe 分析进化分支图; b. 雄性正常组 (NM) 与去势组 (CM) 小鼠肠道菌群物种 LefSe 分析进化分支图。进化分支图由内至外辐射的圆圈代表了由门 (phylum) 至种 (species) 的分类级别, 无显著差异的物种统一着色为黄色, 差异物种着其他颜色。

a. Cladogram based on LefSe analysis of the gut microbiota of females in normal mice (NF) and castrated mice (CF); b. Cladogram based on LefSe analysis of the gut microbiota of males in normal mice (NM) and castrated mice (CM). The circles radiating from the inside to the outside of the cladogram based on LefSe analysis represent the taxonomic level from phylum to species, with species without significant differences uniformly colored yellow, and different species with other colors.

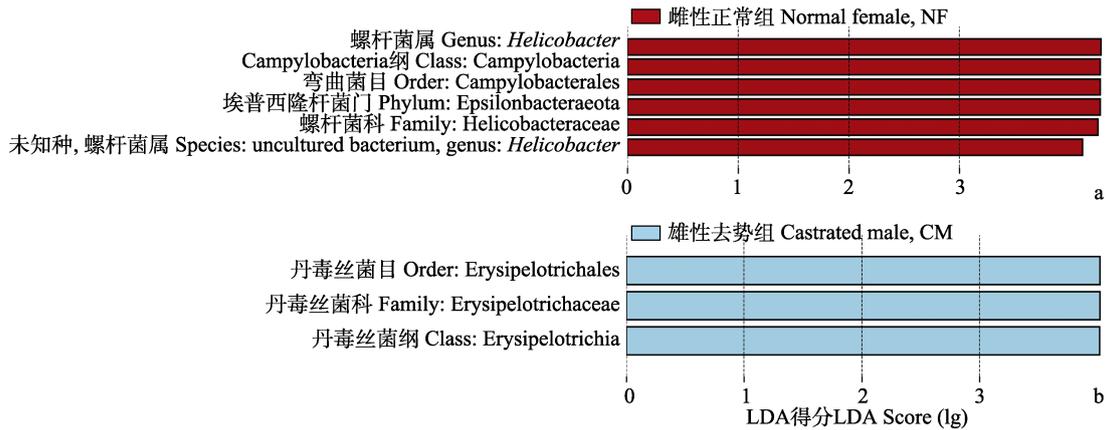


图 7 线性判别 (LDA) 分布柱状图

Fig. 7 Histogram of linear discriminant analysis (LDA) value distribution

a. 雌性; b. 雄性。柱状图的长度代表差异物种的影响大小 (即为 LDA Score), 图中展示了 LDA Score 大于设定值 (默认设置为 4.0) 的物种。

a. Female; b. Male. The length of the histogram represents the impact of different species (i.e., LDA Score). The figure shows the species whose LDA Score is higher than the set value (the default is 4.0).

显差异，差异物种数量较少（图 6b），筛选确定丹毒丝菌纲（*Erysipelotricha*）、丹毒丝菌目（*Erysipelotrichales*）和丹毒丝菌科（*Erysipelotrichaceae*）是发挥重要作用的菌群（图 7b）。

2.5 小鼠肠道菌群 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性结果显示，小鼠雌性正常组（NF）与雌性去势组（CF）组间肠道菌群 ACE 指数、Chao1 指数、Simpson 指数与 Shannon 指数均无显著差异（ $P > 0.05$ ）；小鼠雄性正常组（NM）与雄性去势组（CM）组间肠道菌群 ACE 指数、Chao1 指数、Simpson 指数与 Shannon 指数均无显著差异（ $P > 0.05$ ）（表 5）。

2.6 小鼠肠道菌群 Beta 多样性分析

2.6.1 主成分分析

主成分分析（principal component analysis, PCA）反映了雌雄两组每个个体的数据样本差异和距离。结果显示，雌性正常组（NF）与去势组（CF）1/2 的个体数据聚集在同一象限，表明雌性正常组与去势组

粪便微生物的物种组成有明显的聚集现象，没有较大差异（图 8a）；雄性正常组（NM）与去势组（CM）一半以上的样本聚集在同一象限，表明雄性个体的去势和正常组之间粪便微生物的物种组成差异较小（图 8b）。

2.6.2 置换多元方差分析

置换多元方差分析（permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA）结果显示，雌性小鼠去势组（CF）和正常组（NF）肠道菌群在组间与组内无明显差异（ $R^2 = 0.180$, $P > 0.05$ 图 9a）；雄性去势组（CM）和正常组（NM）小鼠肠道菌群在组间与组内无明显差异（ $R^2 = 0.183$, $P > 0.05$ 图 9b）。

3 讨论

肠道菌群对维持宿主的免疫和消化系统功能发挥重要作用，肠道菌群构成的多样性和丰富度是衡量宿主健康的重要生理指标（Eckburg et al. 2005, Kobozev et al. 2014）。研究表明，

表 5 Alpha 多样性指数统计

Table 5 Alpha diversity statistics

样本名称 Sample ID	OTU 数 OTU numbers	ACE 指数 ACE index	Chao1 指数 Chao1 index	Simpson 指数 Simpson index	Shannon 指数 Shannon index	谱系多样性 Phylogenetic diversity (whole tree)	覆盖率 Coverage
NF1	531	549.968 4	566.150 0	0.977 8	6.777 4	31.951 7	0.999 4
NF2	509	527.703 6	530.666 7	0.979 5	6.648 5	30.889 2	0.999 4
NF3	528	541.151 5	543.256 4	0.976 0	6.378 7	31.842 0	0.999 4
NF4	553	561.888 8	565.500 0	0.978 9	6.743 5	32.712 5	0.999 6
CF1	490	515.789 3	510.567 2	0.927 6	5.165 8	30.412 0	0.999 2
CF2	547	559.957 7	569.037 0	0.964 1	6.506 6	32.259 2	0.999 5
CF3	530	539.707 9	540.156 2	0.986 6	7.074 2	31.468 1	0.999 6
CF4	487	519.822 0	518.016 9	0.958 3	5.558 3	30.315 9	0.999 1
NM1	526	537.281 6	548.235 3	0.983 1	6.903 5	31.544 7	0.999 6
NM2	464	517.174 6	510.105 3	0.900 9	5.195 5	29.379 6	0.998 9
NM3	546	555.393 1	566.300 0	0.971 3	6.702 4	32.420 3	0.999 6
CM1	526	552.363 7	556.357 1	0.958 9	6.225 0	31.524 9	0.999 2
CM2	513	525.891 1	523.553 2	0.962 1	6.203 4	31.253 3	0.999 5
CM3	541	547.373 2	558.500 0	0.987 6	7.259 4	32.102 7	0.999 7
CM4	466	513.290 6	502.982 8	0.962 7	5.828 8	29.604 0	0.999 0

CF. 雌性去势组; CM. 雄性去势组; NF. 雌性正常组; NM. 雄性正常组。

CF. Female castrated mice; CM. Male castrated mice; NF. Female normal mice; NM. Male normal mice.

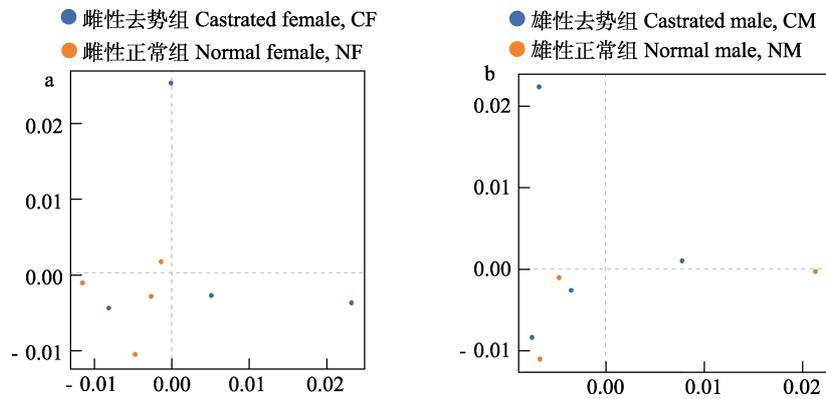


图 8 Beta 多样性 PCA 分析图

Fig. 8 PCA analysis diagram of Beta diversity

a. 雌性; b. 雄性。a. Female; b. Male.

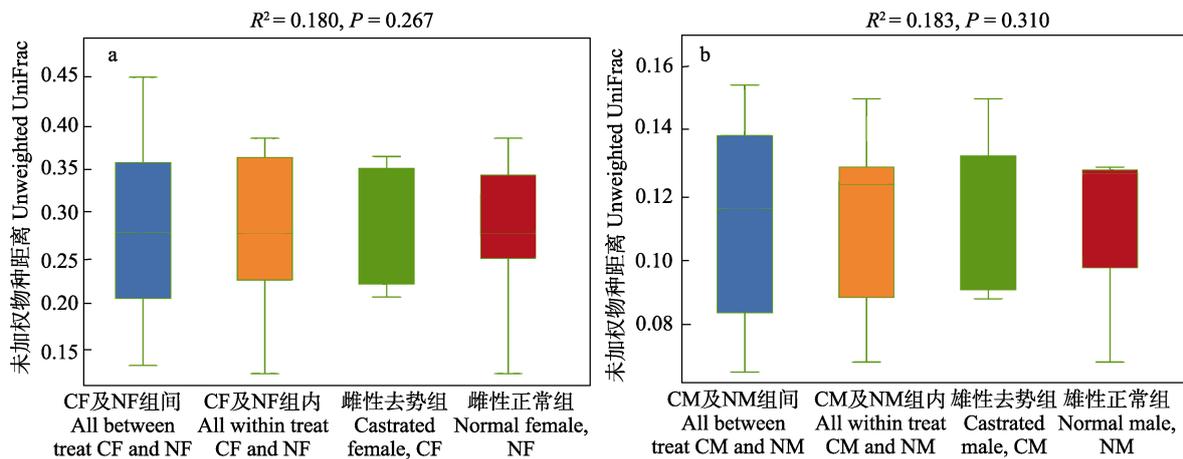


图 9 PERMANOVA 相似性分析箱型图

Fig. 9 PERMANOVA similarity analysis box diagram

a. 雌性; b. 雄性。CF. 雌性去势组; NF. 雌性正常组; CM. 雄性去势组; NM. 雄性正常组。

a. Female; b. Male. CF. Female castrated mice; NF. Female normal mice; CM. Male castrated mice; NM. Male normal mice.

动物肠道菌群构成受多种因素影响，如宿主基因型 (Tsukahara et al. 2013)、年龄 (Mueller et al. 2006, 黄树武等 2021, 柯善林 2021)、性别 (Haro et al. 2016, 谢梦琪等 2021)、疾病 (李鑫洁等 2022, 刘俊希等 2022) 和药物 (赵金华等 2021, 纪文明等 2022) 等，这些因素不同程度影响肠道微生物群的结构和功能。在本研究中，我们采用外科手术方式建立去势小鼠模型，通过 16S rRNA 高通量测序技术检测正

常小鼠及去势小鼠粪便样本中菌群的构成差异，分析性激素变化对小鼠肠道菌群构成的影响，研究结果可为了解性激素对肠道菌群的影响提供基础数据。

本研究血清中激素检测结果显示，与正常组小鼠相比，去势后的雌性和雄性小鼠血清中性激素含量均明显降低，成功建立了去势实验小鼠模型。

16S rRNA 高通量测序实验结果表明，本研

究中的测序数据量合理。雌性正常组和去势组及雄性正常组和去势组小鼠肠道微生物种群共享 OTU 数量高度相似, 超过 97%。正常和去势组小鼠肠道菌群在门水平的主要菌群是厚壁菌门和拟杆菌门, 表明小鼠肠道主要肠道菌群与大多数动物的肠道菌群相似, 例如猪 (*Sus scrofa domestica*, Gresse et al. 2017)、海南坡鹿 (*Cervus eldii*, 王悦等 2018)、林麝 (*Moschus berezovskii*, 杜欣颖等 2021) 等。

曲巍等 (2017) 关于雄性小鼠肠道菌群实验中, 空白对照组小鼠的肠道菌群以拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门为主, 3 个菌门所占比例之和在 91.27% 以上, 与本实验结果一致。孙宏莱 (2022) 等的研究结果显示, 小鼠肠道微生物主要由厚壁菌门、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*)、拟杆菌门、放线杆菌门、变形菌门、脱硫菌门 (*Desulfobacterota*)、脱铁杆菌门和蓝藻细菌门等构成。其中厚壁菌门和拟杆菌门均为优势菌门, 是丰度占比最高的两个菌门。

Alpha 多样性及 Beta 多样性指数分析都表明, 雌性正常组和去势组及雄性正常组和去势组小鼠肠道菌群多样性和丰度均无显著差异。PERMANOVA 分析及 LEfSe 分析表明, 雌性正常组和去势组及雄性正常组和去势组小鼠肠道菌群没有出现显著变化。UPGMA 聚类树及相对丰度分析表明, 雌性正常组和去势组及雄性正常组和去势组小鼠肠道菌群在属水平丰富度前 20 的主要肠道菌群均没有出现显著差异。上述多项分析比较都表明, 性激素变化没有对小鼠肠道菌群丰富度及多样性产生显著影响。

由于本研究中使用的都是昆明白小鼠谱系, 在遗传上无显著差异, 同时小鼠年龄、饲养环境、食物及饮水都保持一致, 小鼠差异主要在去势手术后性激素水平上差异, 但本研究结果显示, 去势引起的性激素差异并没有引起小鼠肠道菌群显著差异, 因此本研究表明, 性激素对肠道菌群结构没有显著影响。已经有不少研究证实了性激素在哺乳动物生长发育过程中同肠道免疫反应和肠道菌群之间的相互作用

(Pace et al. 2021), 但性激素的作用可能会存在物种差异。另外, 选取的实验小鼠数量为 16 只, 可能会存在由于样本量引起的实验误差, 其余外界因素如养殖季节、养殖环境、饲喂的饲料种类及养殖天数都有可能会对实验结果造成影响。我们的研究结果表明, 性激素变化对小鼠肠道菌群构成没有产生显著影响, 这并不说明性激素对肠道菌群没有作用。有研究表明性激素与肠道菌群有着密切关系 (Markle et al. 2013, Bolnick et al. 2014, Elderman et al. 2017)。雄激素及雌激素水平分别与男性及女性的肠道菌群相关, 绝经前后妇女肠道菌群组成差异显著 (范中正等 2021); 女性在更年期雌激素水平大幅度下降的同时肠道内菌群的结构与功能也产生了明显变化, 其中, 肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 细菌、消化链球菌 (*Peptostreptococcus*) 和肠球菌 (*Enterococcus*) 与未更年期时相比显著增加 (郭在清 2015); 相对于比较女性绝经前后及更年期前后的实验对照, 本实验设置了同年龄不同小鼠之间的对照, 减少了因不同年龄段的个体差异所引起的实验误差。另外还有研究发现肠道菌群会对胰岛素抵抗性和肥胖产生影响, 最终扰乱体内雌激素的代谢 (Simó et al. 2015); 性激素可通过直接互动而影响肠道细菌的生理机能 (陶俊等 2021); 雌激素促进免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 分泌以影响肠道菌群, 雌激素受体也在维持肠道菌群稳态中发挥重要作用 (Pace et al. 2021)。因此, 性激素对小鼠肠道菌群影响可能不体现在构成上, 有可能对肠道菌群功能存在影响。未来将会进一步在功能方面开展性激素变化对小鼠肠道菌群影响的相关研究。

参 考 文 献

- Bolnick D I, Snowberg L K, Hirsch P E, et al. 2014. Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nature Communications*, 5(1): 2041–1723.
- Castoria G, Lombardi M, Barone M V, et al. 2004. Rapid signalling pathway activation by androgens in epithelial and stromal cells.

- Steroids, 69(8/9): 517–522.
- Eckburg P B, Bik E M, Bernstein C N, et al. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728): 1635–1638.
- Elderman M, Sovran B, Hugenholtz F, et al. 2017. The effect of age on the intestinal mucus thickness, microbiota composition and immunity in relation to sex in mice. *PLoS ONE*, 12(9): e0184274.
- Ferrando A A, Sheffield-Moore M, Yeckel C W, et al. 2002. Testosterone administration to older men improves muscle function: Molecular and physiological mechanisms. *Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 282(3): 601–607.
- Georget V, Térouanne B, Nicolas J C, et al. 2002. Mechanism of antiandrogen action: Key role of hsp90 in conformational change and transcriptional activity of the androgen receptor. *Biochemistry*, 41(39): 11824–11831.
- Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury M A, et al. 2017. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: Understanding the keys to health. *Trends Microbiol*, 25(10): 851–873.
- Haro C, Rangel-Zuniga O A, Alcalá-Díaz J F, et al. 2016. Intestinal microbiota is influenced by gender and body mass index. *PLoS ONE*, 11(5): e0154090.
- Kadi F. 2008. Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. *British Journal of Pharmacology*, 154(3): 522–528.
- Koboziev I, Reinoso Webb C, Furr K L, et al. 2014. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 68(3): 122–133.
- Markle J G, Frank D N, Mortin-Toth S, et al. 2013. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science*, 339(6123): 1084–1088.
- Mueller S, Saunier K, Hanisch C, et al. 2006. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age gender and country: A cross-sectional study. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2): 1027–1033.
- Pace F, Watnick P I. 2021. The interplay of sex steroids, the immune response, and the intestinal microbiota. *Trends in Microbiology*, 29(9): 849–859.
- Reebye V, Querol Cano L, Lavery D N, et al. 2012. Role of the HSP90-associated cochaperone p23 in enhancing activity of the androgen receptor and significance for prostate cancer. *Molecular Endocrinology*, 26(10): 1694–1706.
- Simó R, Sáez-López C, Barbosa-Desongles A, et al. 2015. Novel insights in SHBG regulation and clinical implications. *Trends Endocrinology, Diabetes & Metabolism*, 26(7): 376–83.
- Tsukahara T, Kishino E, Inoue R, et al. 2013. Correlation between villous height and the disaccharidase activity in the small intestine of piglets from nursing to growing. *Animal Science Journal*, 84(1): 54–59.
- 杜欣颖, 夏介英, 李东晓, 等. 2021. 健康与腹泻林麝肠道菌群的多态性. *中国微生态学杂志*, 33(7): 745–751.
- 范中正, 董万涛, 刘保健, 等. 2021. MicroRNA 通过肠道菌群对绝经后骨质疏松症影响的机制探讨. *中国微生态学杂志*, 33(9): 1100–1103.
- 郭在清. 2015. 更年期综合征人体肠道微生物群落结构研究. *中国微生态学杂志*, 27(4): 477–479.
- 黄树武, 闵凡贵, 王静, 等. 2021. 常用小鼠、大鼠肠道菌群比较研究. *中国实验动物学报*, 29(6): 777–784.
- 纪文明, 刘泉, 刘率男, 等. 2022. 糖尿病治疗药物调控肠道微生物及降糖激素的研究状况. *中国临床药理学杂志*, 38(2): 180–184.
- 柯善林. 2021. 肠道菌群随宿主年龄的动态变化以及对宿主衰老和病原体感染的影响研究. 南昌: 江西农业大学博士学位论文.
- 李鑫洁, 陈建新, 鲁艺. 2022. 锁阳乙酸乙酯提取物对阿尔茨海默病小鼠肠道菌群紊乱的调节作用. *中医学报*, 37(1): 126–134.
- 刘俊希, 王舒, 魏祯, 等. 2022. 中药有效成分通过调节肠道菌群及代谢物组成影响相关疾病治疗作用概述. *中医药学报*, 50(2): 92–97.
- 聂小燕, 林师庆, 何应沛, 等. 2022. 猪在不同阶段肠道微生物的变化及其对营养物质代谢的影响. *黑龙江畜牧兽医*, (11): 39–44.
- 曲巍, 张智, 马建章, 等. 2017. 高通量测序研究益生菌对小鼠肠道菌群的影响. *食品科学*, 38(1): 214–219.
- 邵凡, 段金琳, 李俊英, 等. 2013. 去势对母鸡第二性征发育的影响观察. *中国家禽*, 35(17): 48–49.
- 孙宏莱, 谢雨瞳, 刘悦, 等. 2022. 基于高通量测序技术研究毛水苏多糖对糖尿病小鼠肠道菌群的影响. *中国食品添加剂*, 33(9): 10–18.
- 陶俊, 周漫, 李艳. 2021. 肠道菌群与雄激素的相互作用及对冠心

- 病发病的影响研究进展. 疑难病杂志, 20(8): 842–845.
- 王悦, 苏力, 陈兴永, 等. 2018. 基于16S rRNA测序的海南坡鹿肠道菌群结构分析. 野生动物学报, 39(4): 761–768.
- 吴敏, 刘作华, 齐仁立. 2022. 肠道微生物调控动物肌肉的生长和发育. 动物营养学报, 31(9): 3976–3982.
- 谢梦琪, 张诗雨, 许荔立, 等. 2021. 不同性别和生长阶段对克氏原螯虾肠道菌群多样性的影响. 水生生物学报, 45(6): 1243–1254.
- 袁欣, 陈瑞敏. 2020. 肠道菌群的性别二态性及其潜在影响机制. 生理科学进展, 51(4): 248–252.
- 赵金华, 徐明, 朱美君, 等. 2021. 药物难治性癫痫患儿的肠道菌群变化观察. 山东医药, 61(27): 14–17.
- 赵启群, 孟旭辉. 2008. 雄激素治疗对 PADAM 男子红细胞生成的影响. 南京医科大学学报: 自然科学版, 28(9): 1177–1179.
- 朱丽慧, 廖荣荣, 杨长锁. 2018. 肠道微生物对家禽肠道免疫功能的调节作用及其机制. 动物营养学报, 30(3): 820–828.