



# 高通量测序研究慢性肾衰竭对宠物犬肠道菌群多样性的影响及基因功能预测分析

陆江<sup>1</sup>, 朱道仙<sup>2</sup>, 赵学刚<sup>1</sup>, 刘莉<sup>2\*</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院宠物科技学院, 泰州 225300; 2. 江苏农牧科技职业学院动物医学院, 泰州 225300)

**摘要:**旨在通过高通量测序研究慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)对宠物犬肠道菌群多样性的影响,并预测分析菌群的基因功能。本研究选取30只2岁健康犬,随机等分为慢性肾衰竭模型组(CRF, 肾动脉结扎法制备)、假手术对照组(Sham)和健康对照组(HCG),常规饲养,试验周期56 d。试验过程中,定期检测肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)和尿蛋白/肌酐比(UP/C),无菌采集新鲜粪便进行细菌16S rDNA测序,分析慢性肾衰竭对犬肠道菌群结构、多样性与功能的影响,并以CRF组差异菌群为自变量进行主成分Logistic回归分析,构建菌群标志物综合指数(FMI)用于慢性肾衰竭预测。结果显示:1)从试验后第28天开始,CRF组Scr、BUN和UP/C分别显著高于自身试验前、HCG组和Sham组( $P < 0.05$ )。2)CRF组不同时间点肠道菌群有显著差异,第56天时的Chao 1指数、Shannon指数均降低,拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形杆菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)的相对丰度增加,厚壁菌门(Firmicutes)数量减少,与0 d和28 d比较差异显著( $P < 0.05$ ),与同时间点HCG组及Sham组比较差异显著( $P < 0.05$ )。3)组间菌群LEfSe分析发现,CRF组富集了20个物种,主要包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)和变形杆菌属(*Proteus*)等,这些物种与肠道其他菌属间多呈负相关关系;差异物种基因主要富集在氨基酸代谢、糖生物合成和代谢以及碳水化合物代谢等代谢途径。用这些差异物种构建的FMI,其ROC曲线AUC为0.788,可作为犬CRF的肠道微生物标志物。以上结果表明,慢性肾衰竭可以使犬肠道菌群多样性降低、菌群结构失调以及菌群功能改变,且CRF患犬肠道中富集的菌群可作为该病的肠道微生物标志物,以FMI预测效果最好。

**关键词:**犬;慢性肾衰竭;肠道菌群;16S rDNA测序;菌群多样性;基因功能预测;肠道微生物标志物

中图分类号:S858.2926.59

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2020)10-2590-09

## High Throughput Sequencing to Study the Effect of Chronic Renal Failure on the Diversity and Gene Function Prediction of Gut Microbiota in Dogs

LU Jiang<sup>1</sup>, ZHU Daoxian<sup>2</sup>, ZHAO Xuegang<sup>1</sup>, LIU Li<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pet Science and Technology, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China; 2. Department of Animal Medicine, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the effect of chronic renal failure (CRF) on the gut microbiota diversity and predict the gene function of the flora. A total of 30 2-year-old dogs were selected and randomly divided into the chronic renal failure model group (CRF, established by renal artery ligation), sham operation control group (Sham) and healthy control group (HCG).

收稿日期:2020-03-19

基金项目:江苏高校“青蓝工程”资助项目(00000217009);江苏农牧科技职业学院院级项目(NSF201706);江苏省大学生创新创业训练计划项目(201812806015Y)

作者简介:陆江(1982-),男,江苏新沂人,讲师,硕士,主要从事动物临床营养及代谢病研究, E-mail: vetlj@163.com

\*通信作者:刘莉,主要从事动物临床营养及代谢病研究, E-mail: vetlily@163.com

All animals were fed normally during the 56 days of test period. The serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN) and urine protein / creatinine ratio (UP/C) were detected regularly during the experiment. The effects of chronic renal failure on the structure, diversity and function of gut microbiota were analyzed according to the result of bacterial 16S rDNA sequencing from fresh feces collected without contamination. The flora markers index (FMI) was constructed based on the principal component Logistic regression analysis of different microbiota in CRF group to predict the development of chronic renal failure. The results showed that: 1) The levels of Scr, BUN and UP/C in CRF group from the start of the 28th day of the experiment were significantly higher than those of HCG group and Sham group ( $P < 0.05$ ), and significantly higher than that of the first day of CRF group ( $P < 0.05$ ). 2) Compared with those before chronic renal failure (CRF group at day 0 and 28), HCG group and Sham group, the Chao 1 diversity and Shannon diversity of gut microbiota in CRF group at day 56 were significantly lower ( $P < 0.05$ ), while the relative abundance of Bacteroidetes, Proteobacteria and Actinobacteria significantly increased and the number of Firmicutes significantly decreased ( $P < 0.05$ ). 3) LEfSe analysis showed that 20 species were enriched in CRF group, mainly including *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Proteus* and so on, and most of them had negative correlation with other intestinal bacteria. Functional prediction revealed that genes of those different species were mainly enriched in amino acid metabolism, sugar biosynthesis and metabolism and carbohydrate metabolism in CRF group. The area under ROC curve (AUC) of the FMI constructed with those species enriched was 0.788, which could be used as the intestinal microbial marker for CRF in dogs. In summary, chronic renal failure can reduce the diversity of intestinal microbiota, lead to the imbalance of bacterial structure and change of bacterial function. Moreover, the enriched gut microbiota in CRF group can be used as the intestinal microbial marker of CRF in dogs, and the best prediction effect can be obtained by FMI.

**Key words:** dog; chronic renal failure; gut microbiota; 16S rDNA sequencing; gut microbiota diversity; gene function prediction; intestinal microbial marker

\* **Corresponding author:** LIU Li, E-mail: vetlily@163.com

慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)是犬猫最常见的肾疾病,是犬的第三大致死因素,北美兽医研究集团 NAVRG 调查数据显示,每年有 5.2% 的犬因慢性肾衰竭到宠物医院就诊<sup>[1]</sup>。近年来,该病发病率呈逐年上升趋势,且治疗成本高、并发症众多,严重者甚至可危及生命,已成为当今全球宠物行业关注的问题之一,对宠物诊疗业产生了严峻的挑战。如何进一步延缓疾病进展,延长患病宠物的寿命,提高患病宠物的生活质量以及减轻饲养者经济负担仍是亟待解决的问题。

动物胃肠道中大约有  $10^{13} \sim 10^{14}$  个微生物,这些微生物与宿主相互作用并维持机体健康<sup>[2]</sup>。大量研究表明,人和鼠等动物的肠道菌群失衡与 CRF 的发生发展密切相关<sup>[3-4]</sup>,但在宠物犬中关于肠道菌群与 CRF 的相互作用机制尚不清楚,与

CRF 相关肠道微生物标记物的筛选以及重建肠道菌群平衡对 CRF 的治疗价值等方面研究亦较少。因此,本研究以肾动脉结扎法制作宠物犬 CRF 模型,通过高通量测序研究犬 CRF 不同时期肠道菌群的变化,分析 CRF 与健康对照犬肠道的差异菌群,筛选出 CRF 的肠道微生物标记物,并对差异菌群进行基因功能预测,旨在为宠物犬慢性肾衰竭的发生发展及诊断治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

试验动物为 30 只 2 岁左右的健康雄性贵宾犬(泰迪型),体重为  $(7 \pm 1)$  kg,由江苏农牧科技职业学院宠物科技学院试验犬房提供,于温度、湿度恒定的动物房中适应饲养 1 个月,期间不使用任何抗

生素。

## 1.2 试验设计

按随机数字表将 30 只犬随机等分为慢性肾衰竭模型组(CRF)、假手术对照组(Sham)和健康对照组(HCG),每组 10 只,CRF 组动物均采用肾动脉结扎法制作慢性肾衰竭模型<sup>[5]</sup>,方法为:各试验动物按 0.05 mL·kg<sup>-1</sup>肌肉注射 846 合剂进行麻醉后,常规打开腹腔,显露左肾,游离肾动脉分支,逐一结扎,只保留 1/4~1/6 的动脉供血,第二周切除右肾。假手术对照组动物只做腹腔打开手术,健康对照组不做任何处理。第 4 周末,检测 CRF 组每只犬血清肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)水平,二者升高提示造模成功,然后继续饲养 4 周。整个试验过程所有犬进水及饮食均不受限制。

## 1.3 肾功能指标测定

分别于试验前(记为第 0 天)、试验后第 14、28、42 和 56 天的早晨 8 点,空腹经头静脉采集各组试验犬的血液并制备血清,用 M149928-全自动干式生化分析仪测定 BUN 和 Scr 含量。同时使用采尿杯收集尿液,用改良双缩脲法测定尿蛋白(UP),用威特曼生物科技(南京)有限公司的试剂盒测定尿肌酐(UCr),计算尿蛋白/肌酐(UP/C)比值。

## 1.4 肠道菌群 16S rDNA 高通量测序

1.4.1 粪便采集 CRF 组动物分别于试验前(第 0 天)、试验后第 28 天和试验末(第 56 天)的早晨,用无菌直肠拭子经生理盐水湿润后旋转插入肛门,于肛门隐窝处收集粪便,然后插入无菌管,一 80 °C 保存,并在 24 h 内进行测序。采取相同方法于试验末(第 56 天)收集 HCG 和 Sham 组犬粪便。

1.4.2 粪便总 DNA 提取与 PCR 分析 称取无菌采集的粪便样 100 mg,采用 Qiagen DNA 试剂盒按说明书提取总 DNA,再以获得的细菌 DNA 为模板进行细菌 16S rDNA 的 V3-V4 可变区 PCR 扩增,上游引物 F 为 5'-ACTCCTACGGGAGGCA-GCAG-3',下游引物 R 为 5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3'。扩增程序为:95 °C 预变性 10 min,92 °C 变性 45 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,6 个循环;92 °C 变性 45 s,68 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;然后 72 °C 扩展延伸 10 min,4 °C 保存。采用生工生物工程(上海)股份有限公司的 PCR 产物纯化试剂盒对所得 PCR 产物进行纯化后,用于后续操作。

1.4.3 高通量测序及处理 使用 NEB Next<sup>®</sup>

Ultra<sup>™</sup> DNA Library Prep Kit for Illumina 文库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后,使用 Illumina Miseq PE 300 平台进行 Paired-end 测序。测序数据经 QIIME (version 1.9.1)进行去除接头序列、低复杂度序列和低质量序列的处理,得到高通量原始碱基序列,用 RDF 分类器将相似性大于 97% 的序列划分为一个分类操作单元(OTUs),与 GreenGene 数据库进行比对,得到注释结果。

## 1.5 生物信息学分析

用 QIIME1.9.1<sup>[6]</sup>分析菌群  $\alpha$  多样性(Chao1、Shannon), $\beta$  多样性运用 Canoco5<sup>[7]</sup>进行主成分分析(PCA),组间差异菌群用 LEfSe 分析<sup>[8]</sup>,根据菌种间相关性运用 Cytoscape<sup>[9]</sup>进行菌群间互作网络分析。运用 PICRUSt<sup>[10]</sup>预测菌群基因组功能,与 KEGG 数据库比对,计算 KEGG 通路后进行 STAMP 差异分析。用 R 语言分析菌差异群与 Scr、BUN 的相关性并绘制热图,利用差异菌群丰度进行主成分 Logistic 回归分析计算各样本菌群标志物综合指数(FMI)并绘制 ROC 曲线。

## 1.6 数据处理

肾功能指标数据结果用“平均值±标准差”表示,采用 SPSS 22.0 统计软件 ANOVA 程序单因素方差分析进行组间比较,组内比较采用重复测量资料方差分析。肠道菌群丰度比较采用 Kruskal-Wallis 检验,用 Spearman 分析相关性。 $P < 0.05$  表示差异显著, $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 犬肾功能指标的变化

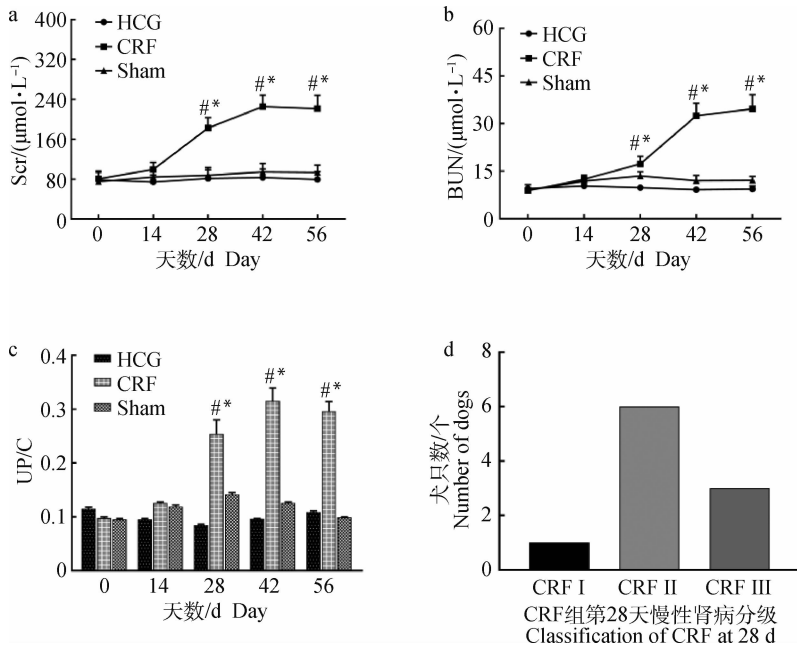
通过图 1 可以发现,CRF 组 Scr、BUN 和 UP/C (图 1a、b、c)逐渐升高,从试验后第 28 天开始明显升高,显著高于试验前(第 0 天)、HCG 组和 Sham 组( $P < 0.05$ ),随后继续升高,说明从第 28 天开始,CRF 组宠物犬发生了慢性肾衰竭。根据 CRF 组第 28 天时 Scr、BUN 和 UP/C 值,参考国际肾病研究协会(IRIS)犬猫慢性肾病分级标准<sup>[11]</sup>,将 CRF 组 10 只犬分别归为慢性肾衰 I 级(CRF I)、慢性肾衰 II 级(CRF II)、慢性肾衰 III 级(CRF III),分别为 1 只、6 只和 3 只(图 1d)。

### 2.2 慢性肾衰竭对犬肠道菌群多样性的影响

肠道菌群  $\alpha$  多样性分析显示:与慢性肾衰竭发生前(CRF-0 d,CRF-28 d)、HCG 和 Sham 组比较,

慢性肾衰竭时(CRF-56 d)出现了 Chao 1 指数( $P < 0.05$ ,图 2a)、Shannon 指数( $P < 0.05$ ,图 2b)显著降低现象。PCA 分析发现,在肠道菌群各样本中,HCG 和 Sham 组个体间离散程度较小,但与 CRF

组(56 d)个体间离散程度较大;CRF 组不同时间段个体间的离散程度较容易区分,从 0 到 28 d,再到 56 d,样本个体有沿 PCA1 轴右移趋势(图 2c)。

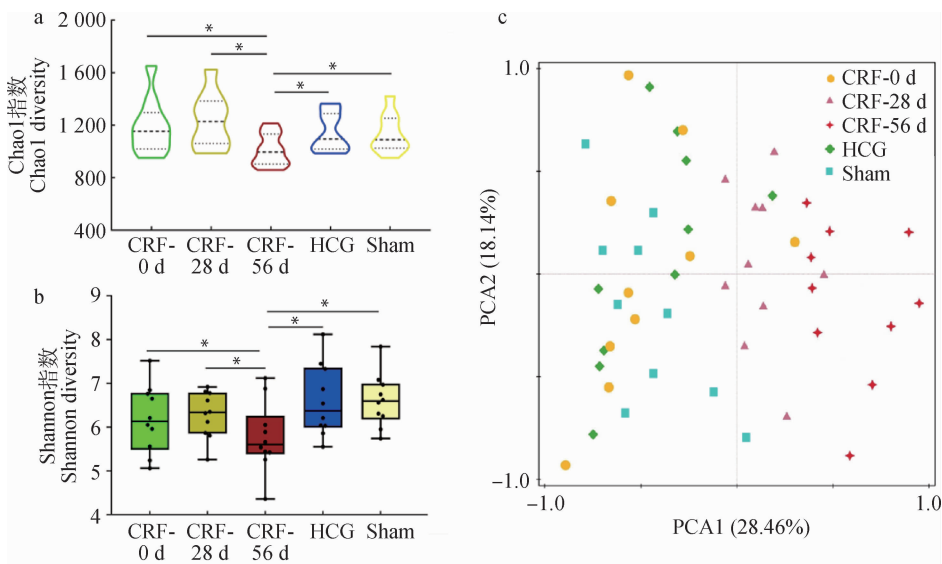


a. 血清肌酐;b. 血尿素氮;c. 尿蛋白/肌酐比值;d. 慢性肾衰分级。“#”表示 CRF 组内与试验前(0 d)相比  $P < 0.05$ ;“\*”表示与 HCG 和 Sham 组相比  $P < 0.05$

a. Serum creatinine;b. Blood urea nitrogen;c. Urinary protein / creatinine ratio;d. Classification of chronic renal failure. “#” Means compared with pre-test (0 d) in CRF group  $P < 0.05$ . “\*” Means compared with HCG and Sham groups  $P < 0.05$

图 1 CRF、HCG 和 Sham 组犬肾功能指标变化

Fig. 1 Changes of renal function indexes in CRF, HCG and Sham groups



a. Chao1 指数;b. Shannon 指数;c. PCA 分析。\*,  $P < 0.05$

a. Chao 1 diversity;b. Shannon diversity;c. Principal component analysis. \*,  $P < 0.05$

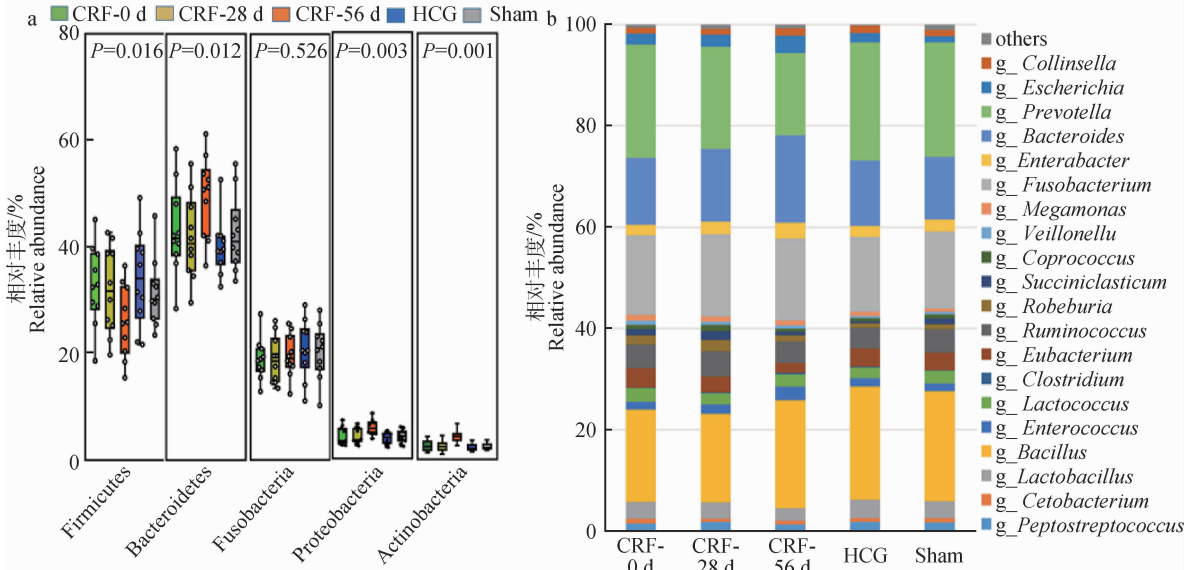
图 2 肠道菌群多样性比较

Fig. 2 Comparison of intestinal flora diversity

### 2.3 肠道菌群组成分析

在门水平上(图 3a),CRF 组不同时期(CRF-0 d、CRF-28 d 和 CRF-56 d)与 HCG 组、Sham 组的肠道菌群主要以拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)为主,但在不同组间有显著差异,主要表现为慢性肾衰时

(CRF-56 d)拟杆菌门( $P<0.05$ )、变形杆菌门( $P<0.01$ )和放线菌门( $P<0.01$ )的相对丰度增加,厚壁菌门数量减少( $P<0.05$ )。在属水平上(图 3b),各组丰度前 20 位菌属无显著变化,主要有普氏菌属(*Prevotella*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、梭杆菌属(*Fusibacterium*)和芽胞杆菌属(*Bacillus*)等。



a. 门水平; b. 属水平

a. Phylum level; b. Genus level

图 3 肠道菌群的构成

Fig. 3 Taxonomic summary of the gut microbiota

### 2.4 不同组间差异菌群 LEfSe 分析

对第 56 天 CRF、HCG 和 Sham 组肠道菌群进行 LEfSe 分析(LDA>2,图 4)发现,从菌群结构上看,CRF、HCG 和 Sham 组之间存在明显差异。在 CRF 组中富集了 20 个物种,主要有变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、芽胞杆菌科(Bacteroidaceae)、放线杆菌科(Actinomycetaceae)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、变形杆菌属(*Proteus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)和涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)等。

### 2.5 差异菌群与 CRF 相关性分析

利用 R 语言对结果 2.4 中的差异菌群与 Scr 和 BUN 进行相关性分析,结果显示,这些菌群均与 Scr 呈正相关,大部分与 BUN 呈正相关(图 5a)。根据 CRF 发生与否,对这些菌群进一步进行主成分

Logistic 回归分析后,得到各样本的菌群标志物综合指数(FMI)并与 Scr 和 BUN 进行相关性分析。发现,FMI 与 Scr、BUN 呈正相关,Spearman 系数分别为 0.788、0.657(图 5b、c)。在用 ROC 曲线建立的 CRF 预测模型中,可以看出,FMI 作为 CRF 预测因子,其曲线下面积(AUC)显著高于假单胞菌属(*Pseudomonas*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)和放线杆菌目(Actinomycetales)等以单一菌群作为微生物标志物的预测模型(图 5d、e)。

### 2.6 肠道菌群互作网络分析

将第 56 天时 CRF 和 HCG 组的不同菌属间分别进行 Cytoscape 网络分析,可以发现,CRF 组富集的菌属与其他菌属间呈负相关关系,且呈正相关关系菌属间网络密度较少(图 6a),HCG 组菌属间呈正相关关系网络密度较多,呈负相关的较少(图 6b)。表明,CRF 组富集的菌属可以抑制其他菌属生长繁殖,HCG 组菌属之间有更好地协作作用。

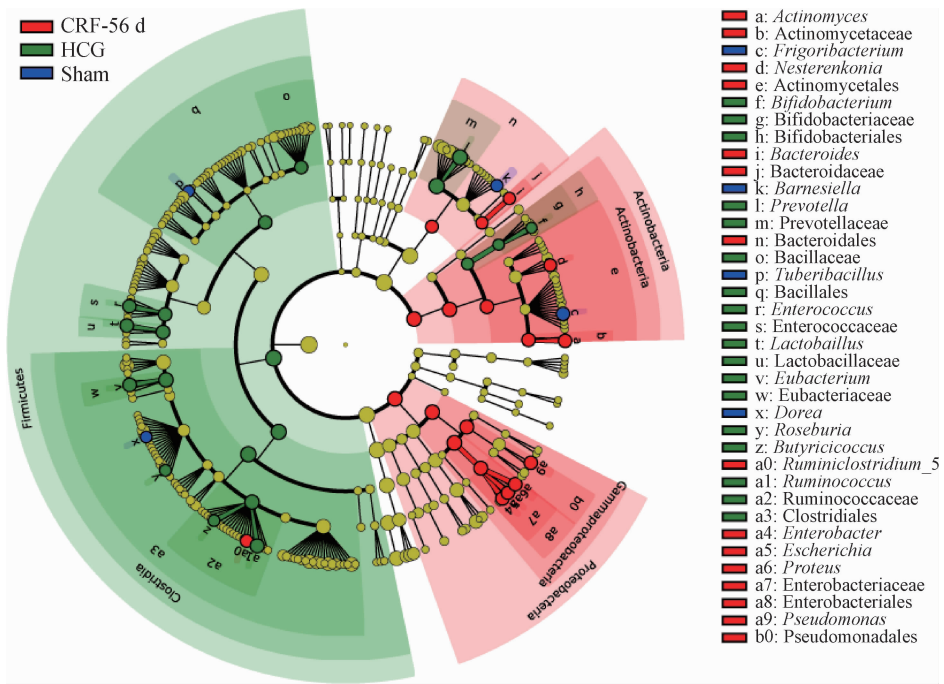
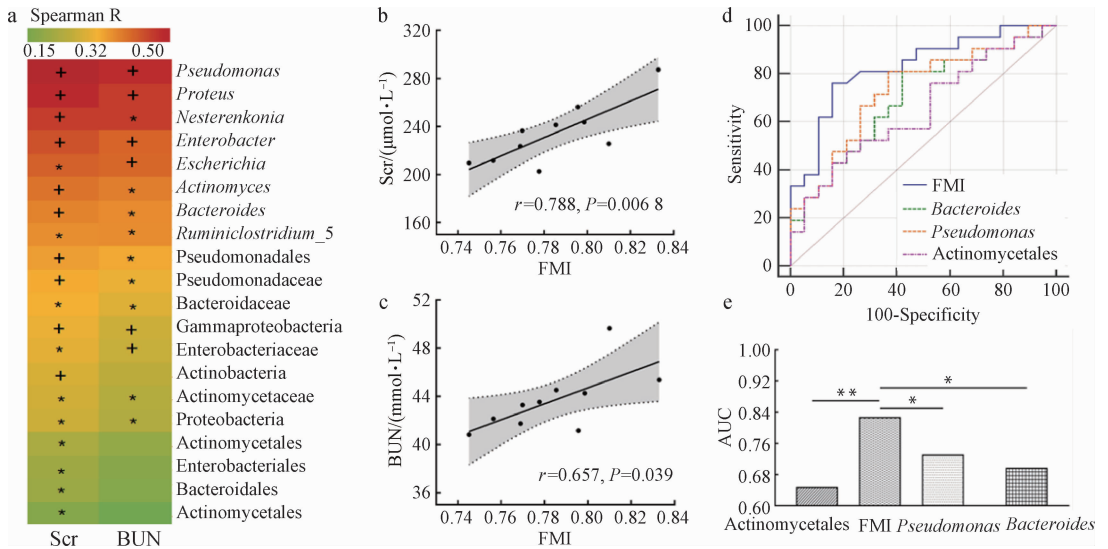


图 4 LEfSe 分析比较各组间差异菌群

Fig. 4 Differential gut bacterial determined by LEfSe analysis



a. 菌群与 Scr、BUN 相关性热图, +  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ ; b. FMI 与 Scr 相关性图; c. FMI 与 BUN 相关性图; d. ROC 曲线图; e. ROC 曲线 AUC 图, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

a. Heatmap of correlation between microflora and Scr, BUN. +  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ ; b. Chart of correlation between FMI and Scr; c. Chart of correlation between FMI and BUN; d. ROC diagram; e. AUC of ROC diagram, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

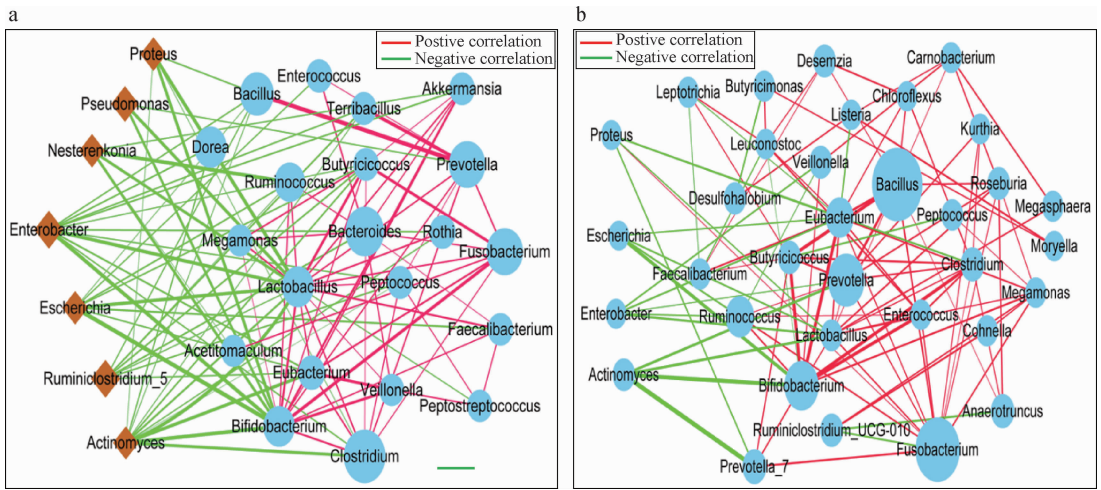
图 5 差异菌群与 CRF 间的关系

Fig. 5 The relationship between differential microflora and CRF

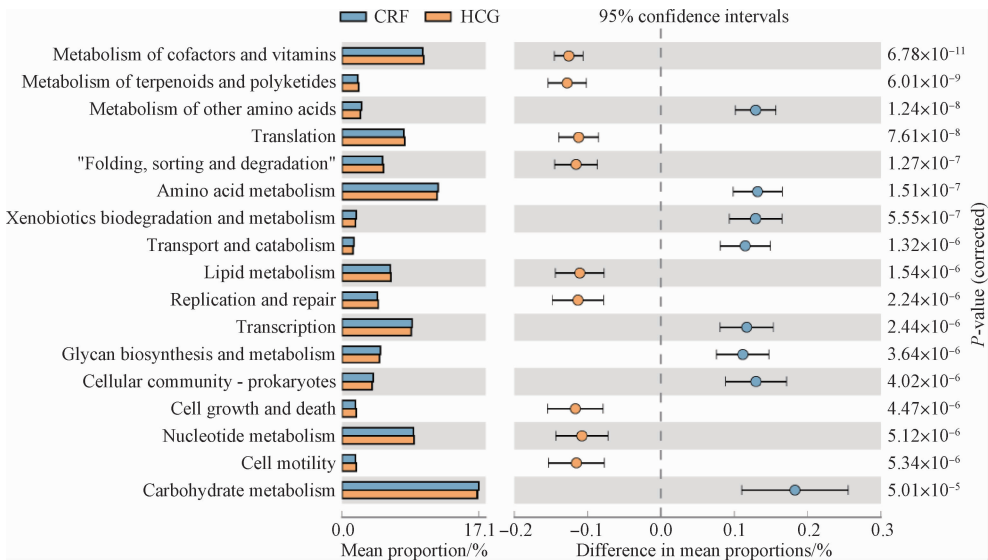
### 2.7 肠道菌群基因功能预测

通过 PICRUSt 分析发现, 试验后第 56 天时在 KEGG L2 水平, CRF 与 HCG 组在代谢途径上存在明显差异(图 7)。CRF 组菌群在氨基酸代谢、外源

生物降解与代谢、运输和分解代谢、DNA 转录、糖生物合成和代谢、细胞群落-原核生物和碳水化合物代谢等功能基因丰度表达显著高于 HCG 组 ( $P < 0.01$ ), 而在辅助因子和维生素代谢、萜类化合物和



a. CRF-56d 组 ;b. HCG 组  
 a. CRF-56d group ;b. HCG group  
**图 6 肠道菌群间互作网络关系图**  
**Fig. 6 Interaction network diagram of intestinal microflora**



**图 7 CRF-56d 组与 HCG 组肠道菌群在 KEGG L2 水平代谢途径差异分析图**  
**Fig. 7 Analysis chart of metabolic pathway difference between CRF-56d group and HCG group at KEGG L2 level**

聚酮类化合物代谢、脂代谢、核苷酸代谢以及遗传信息处理过程中蛋白质翻译、折叠、分类、降解、复制与修复等方面参与度较低( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

在宠物临床上,由于不能同时段收集到大量的犬 CRF 病例资料,导致粪便采样时间、粪便保存与运输条件等方面可能有所不同,会给肠道菌群 16S rDNA 测序结果带来偏差进而影响试验结果。为了保证测序结果的准确性,本研究采取了肾动脉

结扎法制作犬 CRF 模型,在建模第 28 天时,CRF 组 Scr、BUN 和 UP/C 等生化指标急剧升高,表明试验犬发生了慢性肾衰竭,且随后由于残留肾组织的代偿修复,这些指标上升幅度有所减缓,并且无试验动物死亡。与相关报道该法是一种简单、安全、有效和死亡率低的方法相一致<sup>[12]</sup>,可用于犬 CRF 的实验研究。

16S rDNA 是细菌染色体上编码 16S rRNA 相对应的 DNA 序列,存在于所有细菌染色体基因中,具有 9 个高变区域(V1-V9)和 10 个保守区域,高变

区反映了物种间的特异性<sup>[13]</sup>。由于大小适中(约 1.5 Kb 左右),既能体现不同菌属之间的差异,又能利用测序技术较容易地得到其序列,而几乎所有已知细菌的 16S rDNA 碱基序列已被检测鉴定并且存入基因库,所以可以准确分析个体细菌与菌群<sup>[14]</sup>。因此,16S rDNA 测序已经广泛应用于肠道微生物的多样性、物种组成、物种间相互作用关系以及细菌基因功能预测等方面的定性定量研究<sup>[15]</sup>。

本研究发现,CRF 患犬肠道菌群  $\alpha$  多样性显著低于 CRF 初期与建模前,PCA 分析将不同时间段样本明显区分开来,拟杆菌门、变形杆菌门和放线菌门细菌丰度增加。这些结果表明,宠物犬在 CRF 发生发展过程中,伴随着肠道菌群多样性变化。研究表明,在 CRF 时,血液中大量的肌酐和尿素可通过肠黏膜进入肠腔,改变肠道微生态环境,这种变化可能不利于大部分肠道微生物生长繁殖,但含有肌酐水解酶或脲酶的细菌,可以利用肌酐或尿素为它们生长繁殖提供便利条件<sup>[16]</sup>。而且这些菌群在水解尿素时,增加了肠内 pH,可进一步抑制专性厌氧菌生长<sup>[17]</sup>。LEfSe 分析发现,CRF 组富集了 20 个物种,大部分含肌酐水解酶或脲酶,物种丰度与 Scr、BUN 呈正相关,与其他肠道菌群呈负相关关系,也支持了上述观点。因此,可以推测,肠道微环境变化可能是导致 CRF 宠物犬肠道菌群多样性发生变化的主要原因。而且,CRF 犬肠道菌群在氨基酸代谢、糖生物合成和代谢及碳水化合物代谢等方面表现更为活跃,这可能会导致营养物质利用异常、尿毒症毒素产物增加等,加剧 CRF 进程。

目前,寻找疾病的肠道微生物标志物已成为热点并取得显著成果<sup>[18-20]</sup>,Clos-Garcia 等<sup>[21]</sup>发现,肠道微生物标志物对纤维肌痛疾病的预测能力好于其它生物标志物。而本研究显示,CRF 组富集的 20 种差异菌群丰度与 CRF 有良好的正相关关系,但鉴于多种因素与肠道微生物有关,单一或几个菌群作为标记物可能会产生偏差。本研究将这 20 种菌群通过主成分 Logistic 回归分析建立了每个样本的 FMI 并将其视为标记物后,发现 FMI 与 Scr、BUN 的相关性高于单个菌群,其 ROC 曲线的 AUC 较大。表明,FMI 可以更好地用于 CRF 的预测。

本研究尚有局限性:微生物标记物仅在犬试验性 CRF 病例中得出,在现实病例中的可靠性有待进一步验证,今后将进行大规模前瞻性研究,以探索这些细菌作为犬 CRF 微生物标记物的可靠性和实用

性。另外,仅对 CRF 患犬肠道菌群基因功能进行了预测,这些差异菌群基因所表达的代谢产物是否可影响 CRF 的发生发展以及作用机制,也将是一个值得期待的研究。

## 4 结 论

慢性肾衰竭可以导致宠物犬肠道菌群的多样性、组成、菌群间相互作用关系以及基因功能的改变,且与健康犬有差异的菌群可用来预测 CRF 疾病。

## 参考文献(References):

- [1] POLZIN D J. Chronic kidney disease in small animals [J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2011, 41 (1):15-30.
- [2] 陈双双,司华哲,李光玉,等. 动物肠道菌群与营养物质代谢的研究进展[J]. *饲料工业*, 2018, 39(2): 33-36.  
CHEN S S, SI H Z, LI G Y, et al. Research progress of animal gut microbiota and nutrient metabolism[J]. *Feed Industry*, 2018, 39(2): 33-36. (in Chinese)
- [3] YANG T, RICHARDS E M, PEPINE C J, et al. The gut microbiota and the brain-gut-kidney axis in hypertension and chronic kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(7): 442-456.
- [4] NISHIYAMA K, AONO K, FUJIMOTO Y, et al. Chronic kidney disease after 5/6 nephrectomy disturbs the intestinal microbiota and alters intestinal motility[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 6667-6678.
- [5] 王 宁,李 宁,陈 洋. 肾动脉结扎法制作慢性肾功能衰竭犬模型方法的探索[J]. *中国医科大学学报*, 2016, 35(2): 221.  
WANG N, LI N, CHEN Y. Chronic renal failure model in canines by ligation of the renal artery branches[J]. *Journal of China Medical University*, 2016, 35(2): 221. (in Chinese)
- [6] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nat Methods*, 2010, 7 (5): 335-336.
- [7] MORRIS C. Multivariate analysis of ecological data Using Canoco 5, 2nd edition[J]. *Afr J Range For Sci*, 2015, 32(4): 289-290.
- [8] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. *Genome Biol*, 2011, 12(6): R60.



- [9] OTASEK D, MORRIS J H, BOUÇAS J, et al. Cytoscape Automation: empowering workflow-based network analysis[J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1):185.
- [10] 徐 帅, 林奕岑, 周梦佳, 等. 基于高通量测定肉鸡回肠微生物多样性及 PICRUSt 基因预测分析[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(8):2581-2588.
- XU S, LIN Y C, ZHOU M J, et al. Analyzing of ileum microbial diversity of chickens by high-throughput sequencing and PICRUSt predicted [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(8):2581-2588. (in Chinese)
- [11] BOYD L M, LANGSTON C, THOMPSON K, et al. Survival in cats with naturally occurring chronic kidney disease (2000-2002) [J]. *J Vet Intern Med*, 2008, 22(5):1111-1117.
- [12] 肖 炜, 马 云, 傅江南. 慢性肾衰动物模型方法学研究现状 [J]. *中国实验动物学杂志*, 2002, 12(3):176-179.
- XIAO W, MA Y, FU J N. Present study condition of the methodology on CRF animal model [J]. *Chinese Journal of Laboratory Animal Science*, 2002, 12(3):176-179. (in Chinese)
- [13] 孙翠丽, 张 阁, 程汝佳, 等. 16S rRNA 高通量测序方法检测羊圈空气微生物群落结构及多样性 [J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(7):1314-1322.
- SUN C L, ZHANG G, CHENG R J, et al. Microbial community structure and diversity of sheepfold atmosphere by 16S rRNA high-throughput sequencing [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(7):1314-1322. (in Chinese)
- [14] ARCHER S D J, MCDONALD I R, HERBOLD C W, et al. Benthic microbial communities of coastal terrestrial and ice shelf Antarctic meltwater ponds [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6:485.
- [15] CHEN Y F, YANG F L, LU H F, et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2011, 54(2):562-572.
- [16] VAZIRI N D, ZHAO Y Y, PAHL M V. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2016, 31(5):737-746.
- [17] 蒋哲峰, 蒋云生, 林 霞, 等. 肾衰状态下肠道细菌对肌酐和尿素清除的影响 [J]. *中国医师杂志*, 2017, 9(10):1345-1347.
- JIANG Z F, JIANG Y S, LIN X, et al. Effects of urea and creatinine clearing with intestinal bacteria in renal failure [J]. *Journal of Chinese Physician*, 2017, 9(10):1345-1347. (in Chinese)
- [18] SITKIN S I, TKACHENKO E I, VAKHITOV T Y. Metabolic dysbiosis of the gut microbiota and its biomarkers [J]. *Eksp Klin Gastroenterol*, 2016, 12(12):6-29.
- [19] LUN H Z, YANG W H, ZHAO S P, et al. Altered gut microbiota and microbial biomarkers associated with chronic kidney disease [J]. *Microbiologyopen*, 2019, 8(4):e00678.
- [20] REN Z G, LI A, JIANG J W, et al. Gut microbiome analysis as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for early hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2019, 68(6):1014-1023.
- [21] CLOS-GARCIA M, ANDRÉS-MARIN N, FERNÁNDEZ-EULATE G, et al. Gut microbiome and serum metabolome analyses identify molecular biomarkers and altered glutamate metabolism in fibromyalgia [J]. *EBioMedicine*, 2019, 46:499-511.

(编辑 范子娟)