

基于16S rRNA测序的刚毛棉鼠肠道菌群特征研究*

董浩 冯曦 杨纪礼 扬高强 陈磊 董青花 巩薇 梁春南 付瑞 左琴

(中国食品药品检定研究院 国家啮齿类实验动物资源库,北京 102629)

摘要:目的 研究刚毛棉鼠的肠道菌群特征,促进该实验动物资源的开放共享。方法 采集10只刚毛棉鼠的盲肠、结肠和直肠内容物样品,利用16S rRNA通用引物扩增V3-V4区域并进行高通量测序。通过QIIME软件分析各组样品的菌群组成和 α/β 多样性指标,采用LEfSe方法筛选具有统计学差异的菌群标志物。结果 从10只刚毛棉鼠的样本中共获得2 359 297条16S rRNA有效序列。在门的水平上,厚壁菌门、拟杆菌门和疣微菌门在各组样品中都是相对丰度前三的优势菌。 α 多样性分析结果显示,Observed Features、Chao1、Shannon、Simpson、Good's Coverage等5项指标在3组样品中均无显著性差异; β 多样性分析结果显示,盲肠内容物与结肠内容物样品之间存在显著组间差异($P<0.05$);LEfSe分析结果表明,在脱硫杆菌门(Desulfobacterota)、Desulfovibrionia纲、脱硫弧菌目(Desulfovibrionales)、脱硫弧菌科(Desulfovibrionaceae)、脱硫弧菌属(Desulfovibrio)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭菌纲(Clostridia)、毛螺菌目(Lachnospirales)、毛螺菌科(Lachnospiraceae)、颤螺菌目(Oscillospirales)和颤螺菌科(Oscillospiraceae)的细菌为刚毛棉鼠的盲肠内容物中显著性差异的菌群标志物;拟杆菌门(Bacteroidota)、拟杆菌纲(Bacteroidia)、拟杆菌目(Bacteroidales)、Muribaculaceae科的细菌为直肠内容物的肠道菌群内显著性差异的菌群标志物。结论 本研究利用16S rRNA高通量测序技术,系统分析了刚毛棉鼠部分肠段内容物中的肠道菌群组成与丰度特征,为后续开展相关研究提供了基础数据支撑。

关键词:刚毛棉鼠;肠道菌群;16S rRNA 高通量测序

中图分类号:Q95-3 文献标志码:A 文章编号:1006-6179(2026)02-0001-06

DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2026.02.001

Analysis of Characteristics on Gut Microbiota of *Sigmodon Hispidus* Based on 16S rRNA Sequencing

Dong Hao, Feng Xi, Yang Jiliyang, Gao Qiang, Chen Lei, Dong Qinghua,
Gong Wei, Liang Chunnan, Fu Rui, Zuo Qin

(National Institutes for Food and Drug Control, National Rodent Laboratory Animal Resources Center, Beijing 102629, China)

Abstract: Objective This study aimed to investigate the characteristics of gut microbiota of cotton rat (*Sigmodon hispidus*), and promote the open sharing of this laboratory animal resources. **Methods** Cecal, colonic, and rectal contents were collected from 10 cotton rat. The V3 and V4 regions of 16S rRNA was amplified with bacterial universal primers, and high-throughput sequencing was performed. QIIME was used to analyze the bacterial diversity and analyze the differences among the samples from different groups. The LEfSe software was used to determine the biomarkers among different groups. **Results** A total of 2 359 297 valid sequences was obtained from samples of all cotton rat. At the phylum

收稿日期:2024-09-25

* 基金项目:国家重点研发计划(2022YFF0711003)。

作者简介:董浩(1985—),男,副研究员,研究方向为实验动物学。E-mail: tunghao@163.com。

通信作者:付瑞(1978—),男,研究员,研究方向为实验动物病毒学。E-mail: furui78@nifdc.org.cn。

左琴(1975—),女,副研究员,研究方向为实验动物遗传与资源保存。E-mail: zuoqin2001@163.com。

level, Firmicutes, Bacteroidota, and Verrucomicrobiota were the top three dominant bacteria in terms of relative abundance in each group. The alpha diversity analysis showed that there were no significant differences in five indicators, including observed features, Chao1, Shannon, Simpson, and Good's Coverage, among the three groups of samples. The beta diversity analysis result indicated that there was a statistically significant difference between the cecal and colonic contents samples. The result of LEfSe analysis suggested that the bacteria belonging to Desulfobacterota, Desulfovibrionia, Desulfovibrionales, Desulfovibrionaceae, *Desulfovibrio*, Firmicutes, Clostridia, Lachnospirales, Lachnospiraceae, Oscillospirales and Oscillospiraceae were the biomarkers that have significant differences in cecal contents, while the bacteria of the Bacteroidota, Bacteroidia, Bacteroidales, and Muribaculaceae were the biomarkers in the rectal contents. **Conclusion** The composition and abundance characteristics of the gut microbiota of *Sigmodon hispidus* were analyzed by 16S rRNA high-throughput sequencing. It provides basic data for the research on the gut microbiota of *Sigmodon hispidus*.

Key words: *Sigmodon hispidus*; gut microbiota; 16S rRNA sequencing

棉鼠属于啮齿目、仓鼠科、棉鼠属的动物,其中刚毛棉鼠(*Sigmodon hispidus*)常被作为实验动物,应用于生物医药领域和生命科学相关研究中。棉鼠主要分布于美国南部至委内瑞拉北部和秘鲁西北部,其喜欢在草地和灌木丛生活。棉鼠最早在生物医学方面的应用可追溯至 20 世纪 30 年代,美国 NIH 的 Charles Armstrong 等使用刚毛棉鼠替代非人灵长类动物应用于脊髓灰质炎的研究^[1]。直到 1972 年,棉鼠才被引入我国,主要是应用于丝虫病相关的研究。近年来的研究表明,棉鼠对多种呼吸道病毒具有广泛的易感性并能在感染后表现出与人类相似的发病特征。例如,呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、副流感病毒、人偏肺病毒、肠道病毒 D68 等多种病毒均可以采用棉鼠作为动物感染模型^[2-3]。

哺乳动物的肠道内存在着细菌、真菌、病毒和寄生虫等种类繁多、数量庞大的共生微生物。研究表明,肠道菌群可以影响宿主的代谢、营养、免疫、行为和发育等生理过程,从而帮助宿主对饮食变化、环境变化以及病原感染等各种外界应激因素产生适应^[4]。在微观层面,肠道菌群不仅直接参与了对宿主摄入食物的分解代谢过程,还能够合成宿主自身无法合成的必需氨基酸和 B 族维生素等营养物质^[5]。近年来,越来越多的研究表明,肠道菌群在神经系统发育过程同样发挥着重要的作用,肠道菌群-脑-肠轴与人类健康的相关研究已经成为生命科学研究的热点方向^[6]。

目前,国内外关于刚毛棉鼠肠道菌群的研究十分有限。为了更全面地揭示刚毛棉鼠的肠道菌群特征,促进其在生物医药和生命科学等研究领域的

应用,采用 16S rRNA 高通量测序的方法对刚毛棉鼠的盲肠、结肠和直肠内容物的菌群特征分别进行了相关研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:共购入 10 只 6~8 周龄的雌性刚毛棉鼠,来源于斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号为 SCXK(京)2024-0001。上述刚毛棉鼠采用 IVC 型大鼠笼具购自深圳市泓腾生物科技有限公司,单笼饲养于中国食品药品检定研究院独立的屏障级动物实验设施内,饲养至 8 月龄,实验动物使用许可证号为 SYXK(京)2022-0014。刚毛棉鼠在饲养过程中的饲料为⁶⁰Co 辐照灭菌大小鼠繁殖用标准饲料(武汉万千佳兴生物科技有限公司),饮用水为高压灭菌水。本实验已通过中国食品药品检定研究院实验动物福利伦理审查,伦理审批号为 FB2024002。

1.1.2 样品采集:按照 GB/T 39760—2021《实验动物 安乐死指南》,使用 CO₂ 对刚毛棉鼠实施安乐死,在确定动物死亡后,迅速进行解剖,收集上述 10 只 8 月龄雌性刚毛棉鼠的盲肠、结肠和直肠内容物样本,分别置于无菌 EP 管中,立即转入-80℃超低温冰箱保存。交由北京诺禾致源科技股份有限公司进行样品处理、测序及分析。

1.2 方法

1.2.1 粪便样品的总 DNA 提取和 PCR 扩增反应:采用 CTAB 方法提取刚毛棉鼠粪便样品的总 DNA,

检测 DNA 样品的纯度和浓度。检测合格的 DNA 样品使用无菌水将其浓度稀释至 1 ng/ μ L。以稀释后的 DNA 样品作为 PCR 扩增模板,使用带条形码修饰的细菌 16S rRNA 的 V3-V4 区特异性引物(341F: CCTAYGGGRBGCASCAG 和 806R: GGACTACNNGGTATCTAAT)、NEB 公司的 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC 缓冲液进行 PCR 扩增。

1.2.2 PCR 产物的混样和纯化:使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测,并根据 PCR 产物的浓度等量混合各样本产物,使用琼脂糖凝胶回收试剂盒(Qiagen 公司)回收含有目标条带的 DNA 胶块。

1.2.3 文库构建和上机测序:使用 NEBNext[®] Ultra[™] II DNA Library Prep Kit 建库试剂盒构建文库,并分别使用实时荧光定量(qPCR)和 Qubit 荧光定量仪对文库进行定量。使用 NovaSeq 6000 二代测序平台对检测合格的文库进行上机测序。

1.3 测序数据处理及分析

根据条形码和 PCR 引物序列,从下机数据中拆分出对应样本数据,截去条形码和引物序列后,使用 FLASH v1.2.11 软件对各个样本的测序读段进行拼接,从而获得原始数据(Raw Tags)。随后对所获得的原始数据进行质量过滤并去除嵌合体序列,得到可用于后续分析的有效标签序列(Effective Tags)。使用 QIIME 2 软件进行特征序列降噪、物种注释,以及 Alpha 和 Beta 多样性分析,并对不同处理组中的物种丰度数据进行 LEfSe 分析(线性判别分析效应大小)。

2 结果

2.1 16S rRNA 测序序列质量控制

为了研究刚毛棉鼠盲肠、结肠和直肠等不同部位的肠道菌群特征,本研究基于细菌 16S rRNA 的 V3-V4 区域进行了扩增子测序分析。从 30 个测序样本中共获得 3 177 290 条原始序列,平均每个样本获得 105 910 条序列。去除条形码和引物序列后,拼接测序读段并进行质量过滤,共获得 2 359 297 条有效序列。平均序列长度为 421.38 nt(碱基),Q20 值和 Q30 值分别为 98.63% 和 95.33%。上述数据表明测序质量较高,满足后续生物信息学分析的要求。

2.2 ASV 分析

根据各肠段内容物样本的物种注释结果,在盲肠内容物样本中,门水平相对丰度排名前十的菌门包括厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)、疣微菌门(Verrucomicrobiota)、脱硫杆菌门(Desulfobacterota)、放线菌门(Actinobacteriota)、帕氏菌门(Patescibacteria)、广古菌门(Euryarchaeota)、变形菌门(Proteobacteria)、迷踪菌门(Elusimicrobiota)和蓝藻门(Cyanobacteria)。各菌门在不同肠段中的相对丰度见表 1。

表 1 不同组中在门水平上相对丰度前 10 名的物种(%)

Table 1 Top 10 species by relative abundance at the phylum level in different groups(%)

生物分类学	盲肠	结肠	直肠
厚壁菌门	62.78	37.93	45.37
拟杆菌门	23.74	42.67	42.90
疣微菌门	6.34	16.94	8.13
脱硫杆菌门	5.77	0.35	0.59
放线菌门	0.85	1.28	1.93
帕氏菌门	0.46	0.75	0.92
广古菌门	0.00	0.02	0.07
变形菌门	0.04	0.03	0.03
迷踪菌门	0.00	0.01	0.02
蓝藻门	0.00	0.00	0.02
其他	0.00	0.02	0.02

各组样本在属的水平上相对丰度排名前十的菌属如图 1 所示,*Faecalibaculum* 在各组中均为优势菌属(14.93%~23.79%)。*Akkermansia* 菌属在结肠内容物样品中相对丰度较高(16.94%),而在盲肠(6.34%)和直肠(8.13%)样本中的丰度相对较低。*Desulfovibrio* 菌属在盲肠样本中的相对丰度为 5.75%,而在结肠和直肠内容物中依次降低至 0.34% 和 0.58%。*Lachnospiraceae_NK4A136_group* 在盲肠样本中相对丰度为 3.02%,在直肠样本中为 1.49%,在结肠样本中仅为 0.42%。[真杆菌]锡氏菌群([*Eubacterium_siraeum_group*])在直肠样本中相对丰度为 1.18%,在盲肠和结肠中相对丰度分别为 0.43% 和 0.11%。

基于去噪后获得的扩增子序列变体(Amplicon Sequence Variants, ASVs),绘制 Venn 图,对 3 组样本进行分析。如图 2 所示,盲肠、结肠和直肠内容物 3 个组别中共有的 ASVs 为 682 个,三者中各自特有的 ASVs 数量分别为 1 273、1 420 和 1 751 个。

2.3 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性主要用于分析样本内的微生物群

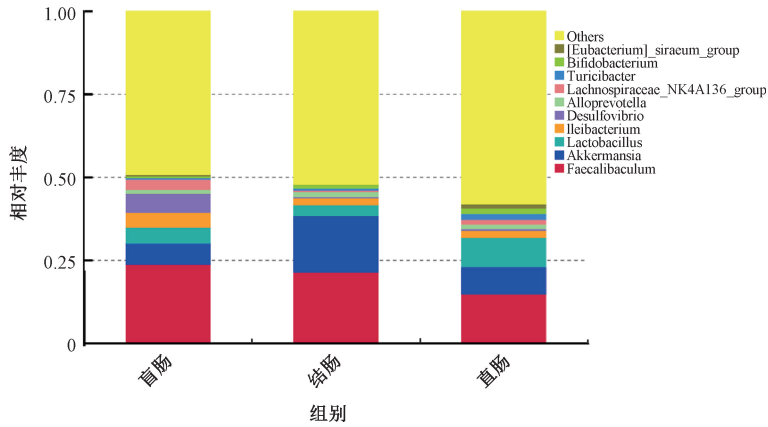


图 1 各组样本中属水平相对丰度前十的菌属

Fig. 1 The top 10 genera in relative abundance at the genus level across groups

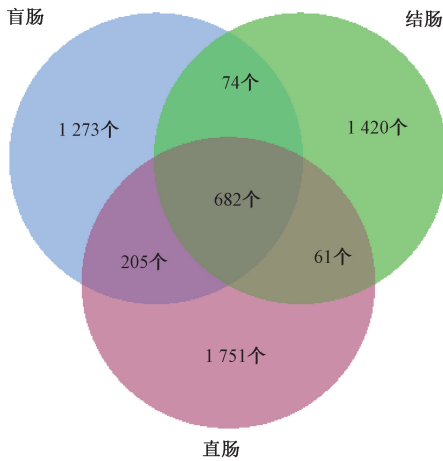


图 2 各组样本 ASVs 的 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of ASVs in each group

落的丰富度与多样性,可用于评估刚毛棉鼠肠道内容物菌群的内部结构特征。如图 3 所示,随着测序量的增加,各样中的观测 OTU 数 (observed_OTUs) 趋于稳定,表明测序深度已达到饱和,可满足后续分析需求。

在 Alpha 多样性分析中,分别计算了观测特征数 (Observed features)、Chao1 指数、香农指数 (Shannon)、辛普森指数 (Simpson) 和 Good's 覆盖率 (Good's coverage) 等 5 项指标 (表 2),经 Tukey 检验和 Kruskal-Wallis 秩和检验分析发现,盲肠、结肠与直肠组样本间在上述指标上均无显著性差异。

表 2 各组肠道菌群样本的 Alpha 多样性指数
Table 2 Alpha diversity indices of gut microbiota samples across different groups

样本类型	Chao1 指数	Good's 覆盖率	观测特征数	香农指数	辛普森指数
盲肠	2 387.070	0.999	2 234	6.482	0.945
结肠	2 344.206	0.999	2 237	5.953	0.931
直肠	2 892.734	0.999	2 699	6.598	0.965

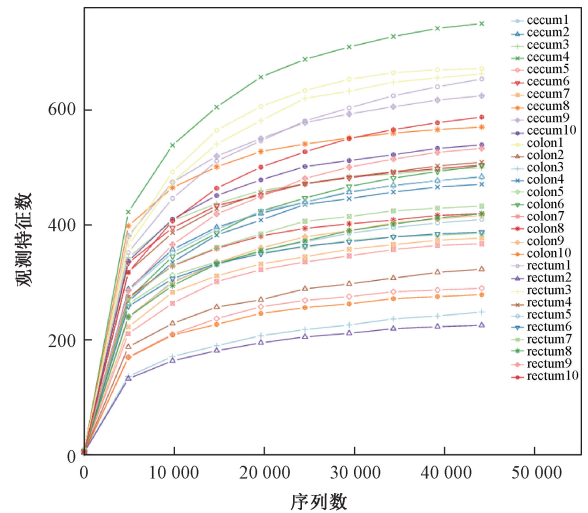


图 3 各组样品 16S rRNA 扩增子的稀释曲线

Fig. 3 Rarefaction curves of 16S rRNA gene amplicons from the samples

2.4 Beta 多样性分析

Beta 多样性用于分析不同样本间微生物群落结构的差异。基于无权重 Unifrac 距离 (Unweighted UniFrac) 矩阵的 PCoA 分析结果显示,盲肠样本分布相对集中,而结肠和直肠样本分布较为分散。在主成分分析中,第一主成分 (PC1) 和第二主成分 (PC2) 的解释率分别为 17.06% 和 9.55% (图 4)。通过 ANOSIM 检验各组间微生物菌落结构差异,结果显示,盲肠与结肠 (cecum vs colon) 及盲肠与直肠 (cecum vs rectum) 的 R 值分别为 0.17 和 0.12,说明盲肠样本与结肠样本、盲肠样本与直肠样本之间的组间差异均大于组内差异。其中,盲肠与结肠样本之间比较的 P 值小于 0.05,表明两者的菌群结构存在显著差异,具有统计学意义。

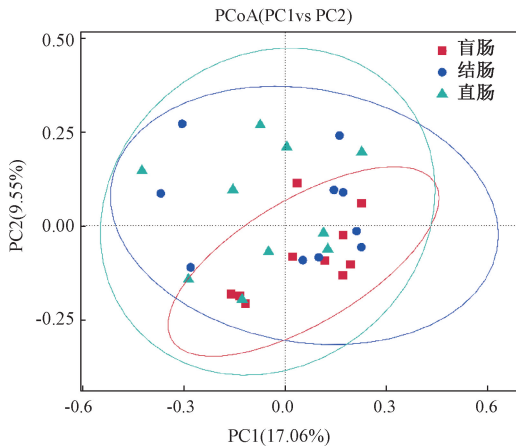


图 4 各组样品基于 Unweighted UniFrac 距离的 PCoA 分析图

Fig. 4 PCoA plot based on Unweighted UniFrac distance of samples from each group

2.5 组间物种差异分析

采用 LEfSe (线性判别分析效应大小) 方法分析刚毛棉鼠三段肠道内容物样本中物种丰度的显著性差异。如图 5 所示,“红色”节点表示在盲肠内容物样本中显著富集的细菌类群,“绿色”节点表示在直肠内容物样本中显著富集的细菌类群。在盲肠内容物样本中,脱硫杆菌门 (Desulfobacterota)、Desulfovibrionia 纲、脱硫弧菌目 (Desulfovibrionales)、脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、厚壁菌门 (Firmicutes)、梭菌纲 (Clostridia)、毛螺菌目 (Lachnospirales)、毛螺菌科 (Lachnospiraceae)、颤螺菌目 (Oscillospirales) 和颤螺菌科 (Oscillospiraceae) 的细菌显著富集。在直肠

内容物样本中,拟杆菌门 (Bacteroidota)、拟杆菌纲 (Bacteroidia)、拟杆菌目 (Bacteroidales) 及 Muribaculaceae 科的细菌显著富集。

3 讨论

肠道菌群是人和各种动物肠道内最复杂且多样的微生物群落,在维持肠道结构与功能、促进营养代谢、调节免疫系统及抵御病原微生物等方面发挥着关键作用^[7-9]。因此,肠道菌群研究对于阐明宿主健康维持机制及疾病发生发展的过程具有重要意义。目前,尚无关于刚毛棉鼠肠道菌群的研究发表。

本研究中首次采用 16S rRNA 扩增子测序技术,对刚毛棉鼠不同肠段肠道内容物中细菌 16S rRNA 的 V3-V4 区进行了分析。结果显示,厚壁菌门、拟杆菌门、疣微菌门、脱硫杆菌门、放线菌门在刚毛棉鼠盲肠、结肠及直肠样本中均为优势菌门。相比之下,已有研究表明, KM、C57BL/6J、BALB/c、NIH 4 种小鼠品系的肠道菌群主要由拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门、Epsilonbacteraeota 门和疣微菌门构成^[10]。在 SD、Wistar、F344 和 BN 4 种大鼠中,主要优势菌门为拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门、蓝细菌门^[11]。在树鼩中,变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门为主要优势菌群,其中前两者的相对丰度超过 90%^[12]。综合上述可见,刚毛棉鼠的肠道菌群组成在菌群结构和主要优势菌门方面与小鼠、大鼠、树鼩等常见实验动物存在明显差异。

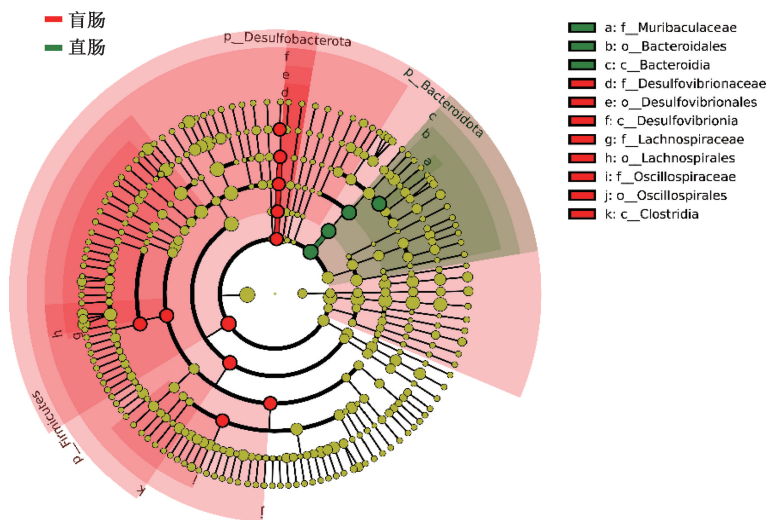


图 5 基于 LEfSe 分析的 LDA 分类图

Fig. 5 LDA cladogram generated by LEfSe analysis

在对刚毛棉鼠的盲肠、结肠和直肠内容物样本的分析中, Beta 多样性结果显示盲肠与结肠菌群多样性之间差异显著, 提示不同肠段的微生物组成差异可能与其在营养物质消化等生理功能方面的分工相关; 在门水平的相对丰度比较中, 结肠与直肠菌群的组成更为多样。盲肠中脱硫杆菌门和厚壁菌门下的部分细菌显著富集, 而直肠中拟杆菌门下部分细菌被识别为具有统计学显著差异的生物标志物 (Biomarkers)。在前期研究中, 黄树武等^[10]对 NIH 小鼠不同肠段的菌群进行分析, 发现盲肠与结肠中优势菌群主要包括未分类的 *Muribaculaceae* 属、*Lactobacillus* 属、*Helicobacter* 属 (螺杆菌属)、*Muribaculum* 属和 *Alloprevotella* 属。而在直肠中, *Helicobacter* 属 (螺杆菌属) 为优势菌属, 此外还存在少量 *Lactobacillus* 属、未分类的 *Muribaculaceae* 属和 *Pseudomonas* 属。可见, 小鼠在各肠段中相对丰度最高的前 3 种菌属基本一致, 与本研究刚毛棉鼠不同肠段菌群结构较为稳定的结果相符。但值得注意的是, 刚毛棉鼠与小鼠在不同肠段的菌属组成上仍存在明显差异, 仅 *Lactobacillus*、*Desulfovibrio* 和 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 3 个属在两种动物中均有出现。

本研究利用 16S rRNA 高通量测序技术, 分析了刚毛棉鼠部分肠道内容物的肠道菌群组成, 为今后相关研究提供了基础数据支撑。但本研究也存在一定的局限性, 例如未涵盖小肠段的菌群信息, 亦未考察性别和周龄等因素对菌群结构的影响。未来的研究中, 我们将继续针对上述方面对刚毛棉鼠肠道菌群的实验数据进一步补充, 完善刚毛棉鼠肠道菌群的全貌。

参 考 文 献

[1] 富群华. 棉鼠的生物学特性及应用 [J]. 上海实验动物科学,

1998 (1): 57-59.

- [2] GRIEVES J L, YIN Z, DURBIN R K, et al. Acute and chronic airway disease after human respiratory syncytial virus infection in cotton rats (*Sigmodon hispidus*) [J]. *Comp Med*, 2015, 65: 315-326.
- [3] STRICKLAND B A, RAJAGOPALA S V, KAMALI A, et al. Species-specific transcriptomic changes upon respiratory syncytial virus infection in cotton rats [J]. *Sci Rep*, 2022, 12 (1): 16579.
- [4] SUZUKI T A, LEY R E. The role of the microbiota in human genetic adaptation [J]. *Science*, 2020, 370 (6521): eaaz6827.
- [5] FEI N, ZHAO L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice [J]. *ISME J*, 2013, 7 (4): 880-884.
- [6] 冯莉娟, 李子纯, 刘小伟. 肠道菌群-肠-脑轴的研究进展 [J]. 中华消化杂志, 2022, 42 (2): 134-136.
- [7] O' HARA A M, SHANAHAN F. The gut flora as a forgotten organ [J]. *EMBO Rep*, 2006, 7 (7): 688-693.
- [8] LEY R E, HAMADY M, LOZUPONE C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes [J]. *Science*, 2008, 320 (5883): 1647-1651.
- [9] KAMADA N, SEO S U, CHEN G Y, et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 (5): 321-335.
- [10] 黄树武, 闵凡贵, 王静, 等. 常用小鼠、大鼠肠道菌群比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29 (6): 777-784.
- [11] 张乐颖, 柳文霞, 董浩, 等. 基于 16S rDNA 高通量测序技术研究常见大鼠的肠道菌群特征 [J]. 实验动物科学, 2024, 41 (6): 75-81.
- [12] 杨学芳, 李波, 郑红, 等. 树鼯肠道菌群多样性与功能预测研究 [J]. 安徽农业科学, 2019, 47 (8): 101-103; 113.

[引用本文]

董浩, 冯曦, 杨纪礼, 等. 基于 16S rRNA 测序的刚毛棉鼠肠道菌群特征研究 [J]. 实验动物科学, 2026, 43 (2): 1-6.

Dong H, Feng X, Yang J L Y, et al. Analysis of characteristics on gut microbiota of *Sigmodon Hispidus* based on 16S rRNA sequencing [J]. *Lab Anim Sci*, 2026, 43 (2): 1-6.

DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-6179. 2026. 02. 001.