

朱道仙, 陆江, 赵学刚, 等. 大黄素通过选择性调节肠道菌群缓解犬慢性肾衰竭[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(6): 1489-1497.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.06.019

大黄素通过选择性调节肠道菌群缓解犬慢性肾衰竭

朱道仙¹, 陆江², 赵学刚², 刘莉¹, 吴双^{1,3}

(1. 江苏农牧科技职业学院动物医学院, 江苏 泰州 225300; 2. 江苏农牧科技职业学院宠物科技学院, 江苏 泰州 225300; 3. 江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室, 江苏 泰州 225300)

摘要: 为研究大黄素对犬慢性肾衰竭(CRF)的治疗效果与对肠道菌群的调节作用之间的关系, 探究大黄素延缓 CRF 的作用机制, 采用 34 例犬慢性肾衰竭病例, 其中大黄素治疗组(RT)22 例, 常规治疗组(UT)12 例。UT 组患犬口服复方 α -酮酸片+肾脏处方粮; RT 组在 UT 组基础上按 100 mg/(kg · d) 口服大黄素, 治疗期为 45 d。定时采集患犬血液, 检测尿毒素水平并无菌收集患犬粪便, 用于肠道菌群 16S rDNA 测序及其代谢物检测。将 2 组治疗前后的患犬粪菌液移植给慢性肾衰竭模型无菌小鼠, 验证患犬肠道菌群对 CRF 的影响。结果显示: RT 组患犬的血清肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)、硫酸吡啶酚(IS)和硫酸对甲酚(PCS)含量逐渐降低, 肠道菌群丰度增加, 与试验前及 UT 组有显著差异; 菌群结构也发生改变, 表现为肠杆菌科、假单胞菌科等细菌丰度逐渐降低, 而普氏杆菌属、乳杆菌属、丁酸梭菌属和双歧杆菌属等有益菌逐渐成为优势菌群, 与 UT 组有差异。RT 组肠道菌群在遗传信息处理、核苷酸代谢、辅助因子和维生素代谢等代谢途径方面表现活跃, 患犬粪中代谢物丁酸含量升高, 吡啶与 H₂S 含量逐渐降低, 与试验前及 UT 组有显著差异, 这些代谢物含量的变化趋势与其生产菌群的变化趋势相一致。慢性肾衰竭无菌小鼠粪菌移植结果表明, RT 组试验后的粪菌可以显著降低小鼠血中 Scr 和 BUN 含量。以上结果说明, 大黄素可以使 CRF 犬紊乱的肠道菌群重建平衡, 改变细菌代谢物水平, 从而减少肠道菌群对犬慢性肾衰竭的不良影响。

关键词: 大黄素; 犬; 慢性肾衰竭; 肠道菌群; 16S rDNA 测序

中图分类号: S858.292.659

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2020)06-1489-09

Alleviation of chronic renal failure in dogs through selectively regulation of gut microbiota by emodin

ZHU Dao-xian¹, LU Jiang², ZHAO Xue-gang², LIU Li¹, WU Shuang^{1,3}

(1. Department of Animal Medicine, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China; 2. Department of Pet Science and Technology, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China; 3. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Veterinary Bio-pharmaceutical High-tech Research, Taizhou 225300, China)

Abstract: To study the relationship between the therapeutic effect of emodin on chronic renal failure (CRF) and the regulating effect of emodin on gut microbiota in dogs, so as to explore the mechanism of emodin in alleviating CRF, 34 cases of CRF dogs were used, among which emodin treatment group (RT) contained 22 cases and usual treatment group

(UT) contained 12 cases. The dogs in the UT group were given prescription diet containing compound α -ketoacid tablets plus kidney, while the dogs in the RT group were given 100 mg/(kg · d) emodin by oral on the basis of the prescription in the UT group, the treatment period was 45 days. Blood of the dogs was collected regularly to detect the level of urotoxin and feces of the dogs were collected aseptically for 16S rDNA sequencing of gut microbiota and

收稿日期: 2020-04-18

基金项目: 江苏省 333 高层次人才培养工程或“六大人才高峰”项目 (NY-009); 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: 朱道仙 (1978-), 女, 安徽寿县人, 硕士, 讲师, 主要从事动物临床营养及代谢病研究。(Tel) 13921700082; (E-mail) 331802901@qq.com

通讯作者: 吴双, (E-mail) jswshuang@sina.cn

related metabolites detection. The fecal bacterial solution of the two groups before and after treatment were transplanted into germ-less CRF mice respectively to verify the effect of gut microbiota on CRF. The results showed that the contents of serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), indole sulfate (IS) and *p*-cresol sulfate (PCS) of dogs in RT group decreased gradually and the abundance of gut microbiota increased, which showed significant difference with the group before test and UT group. The microflora structure also changed, presented as the abundance of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae decreased gradually, while the beneficial bacteria such as *Proteus*, *Lactobacillus*, *Butyricoccus* and *Bifidobacterium* gradually became the dominant microflora, which was different from UT group. The gut microbiota of RT group was active in metabolic pathways such as genetic information processing, nucleotide metabolism, cofactor and vitamin metabolism. The content of butyric acid in feces of the dogs from RT group increased, while the content of indole and H_2S decreased gradually, which showed significant difference with the group before test and UT group. The change trend of these metabolites was consistent with the change trend of the productional flora. The result of fecal bacteria transplanting of the aseptic CRF mice showed that fecal bacteria from the RT group after experiment could significantly reduce the contents of Scr and BUN. In summary, emodin can restore the disarranged gut microbiota and change the levels of bacterial metabolites in CRF dogs, thus reduce the adverse effects of gut microbiota on CRF.

Key words: emodin; dog; chronic renal failure; gut microbiota; 16S rRNA sequencing

近年来,犬的慢性肾衰竭(CRF)发病率逐年上升,治愈率低、成本高,对宠物诊疗业产生了严峻的挑战。慢性肾衰竭与肠道菌群间关系密切,前者可以导致后者发生紊乱,后者紊乱又可加剧CRF的发展,最终恶化病情^[1-2]。因此,肠道菌群是一个复杂的微生物生态系统,增加有益菌丰度对动物健康至关重要^[3-5],调节肠道菌群有望成为治疗犬慢性肾衰竭的新方式。

大黄素具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用^[6],可以通过调节肠道菌群治疗多种疾病^[7-9]。虽然有报道发现大黄素对CRF具有疗效^[10],但是否与调节肠道菌群有关却鲜有报道,而且也有研究结果表明大黄素对猫CRF无治疗价值^[11]。大黄素对犬CRF是否具有治疗作用以及是否与调节肠道菌群有关,是一项值得研究的课题。因此,本试验给CRF患犬口服大黄素后,观察尿毒素指标和肠道菌群的动态变化,探讨二者间的因果关系,从肠道菌群调控角度阐释大黄素治疗犬慢性肾衰竭的作用机制,为临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料

选取2017年7月至2019年7月期间,到江苏农牧科技职业学院动物医学院教学宠物医院就诊的诊断慢性肾衰竭的患犬45例,按照纳入标准剔除11例,剩余病例用于研究。研究纳入标准为:①符合国际肾病研究协会(IRIS)犬猫慢性肾病诊断标

准^[12];②就诊前1个月内未使用抗生素、益生菌或微生态调节剂等;③未伴有其他疾病,如胃肠道疾病,尿路感染、急性肾炎、尿结石等泌尿道疾病,心脏病、糖尿病、肥胖症等可导致肾功能障碍的疾病以及各种感染性疾病。所有研究病例的主人均对本研究计划有详细的了解,并签署知情同意书。

1.2 临床治疗试验

按随机数字表法将34例病例随机分成大黄素治疗组(RT组, $n=22$)和常规治疗组(UT组, $n=12$)。UT组患犬治疗方案为口服复方 α -酮酸片(摩登狗生物科技有限公司产品,1片/次,2次/d)+自由采食肾脏处方粮(上海信元动物药品有限公司生产),RT组在UT组治疗的基础上按100 mg/(kg·d)口服大黄素,自由饮食,治疗期为45 d。并分别于治疗前(0 d)与治疗15 d、30 d、45 d早晨,空腹采集血液,用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)、硫酸吡啶酚(IS)和硫酸对甲酚(PCS)含量。同时,经无菌直肠采集粪便后平分成4份,分别用于短链脂肪酸(SCFA)含量检测(气相色谱/质谱法)、 H_2S 含量检测(亚甲基蓝法)、吡啶含量检测(分光光度计法)和肠道菌群16S rDNA测序。

1.3 慢性肾衰竭无菌小鼠粪菌移植试验

1.3.1 粪菌液制备 试验前收集3例RT组患犬粪便并充分混匀,结束后再次收集相同病例粪便并充分混匀,UT组粪便收集方法同RT组。最终制成4种粪便样本,分别为UT组试验前(U-pre)和试验后

(U-post)、RT 组试验前(R-pre)和试验后(R-post)。在无氧室中,分别取各个粪便样本 0.5 g,加入 25 ml 无菌 Ringer's 缓冲液稀释,充分搅匀后静置 5 min,然后将上清液转移到干净的试管中,并添加等量 20% (质量体积比) 无菌脱脂乳溶液,制成粪菌液。试验当天制备新鲜粪菌液,其余的保存在 -80°C 备用。

1.3.2 慢性肾衰竭无菌小鼠粪菌移植 将 32 只断奶的无菌 C57BL/6J 雄性小鼠在 12 h (日)/12 h (夜) 光周期下饲养于柔性薄膜塑料隔离器中,喂食经过消毒的正常食物与水,在粪菌移植前定期收集粪便、食物、水和填料等样本进行细菌学检查来监测细菌污染情况。在 7 周龄时,随机将小鼠等分为 4 组(每组单独隔离),参考 Michael 等^[13]的方法,第 1 周给各组小鼠按 250 mg/kg 体质量隔天灌服腺嘌呤,后 3 周按 150 mg/kg 体质量隔天灌服腺嘌呤。建模成功后,4 组小鼠分别口服 100 μl 下列粪菌液:U-pre、U-post、R-pre 和 R-post,并于第 2 d 加强 1 次。分别于口服粪菌液前和口服后 30 d,空腹收集各组小鼠血液用于 Scr、BUN、IS 和 PCS 的检测,检测方法同方法 1.2,同时采集粪便进行 16S rDNA 测序。

1.4 肠道菌群 16S rDNA 高通量测序

称取无菌粪便样 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)序列为 5'-ACTCCTACGGGAG-GCAGCAG-3',下游引物(R)序列为 5'-GGACTG-CACGGGTATCTAAT-3'。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,92 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,6 个循环;92 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,30 个循环;然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 扩展延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 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 NEB Next[®] Ultra[™] DNA Library Prep Kit for Illumina 建库试剂盒进行文库构建,使用 Illumina Miseq PE 300 平台进行 Paired-end 测序。

1.5 生物信息学分析

将测序数据经 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。用贝叶斯分类器将相似性大于 97% 的序列划分为 1 个分类操作单元(OTU),与 GreenGene 数据库进行比对,得到 OTU 注释结果及

丰度。OTU 数量差异用 Kruskal-Wallis 检验,将各样本 OTU 丰度标准化后进行主成分分析(PCA)。通过 LEfSe 分析^[14] 组间差异菌群,并绘制聚类热图,运用 PICRUSt 软件^[15] 预测菌群基因组功能,与京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG) 比对,获得 KEGG 直系同源基因簇(KO) 注释信息及丰度,进而进行 KEGG 代谢通路的差异分析。

1.6 数据处理

血液指标及粪代谢物数据结果用平均值 \pm 标准差表示,采用 SPSS 22.0 统计软件方差分析(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,分类资料用 Pearson 卡方检验。肠道菌群数据比较采用 Kruskal-Wallis 检验。 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 研究对象的基本特征

本试验所用犬 CRF 病例共有 34 例,其中 RT 组 22 例,UT 组 12 例(表 1)。与 UT 组比较,RT 组 Scr 及 BUN 水平、性别构成、年龄分布、体质量情况、饲养方式和生活环境等均无显著差异($P>0.05$)。

表 1 纳入研究病例的基本特征

Table 1 Basic characteristics of dogs with chronic renal failure used in this study

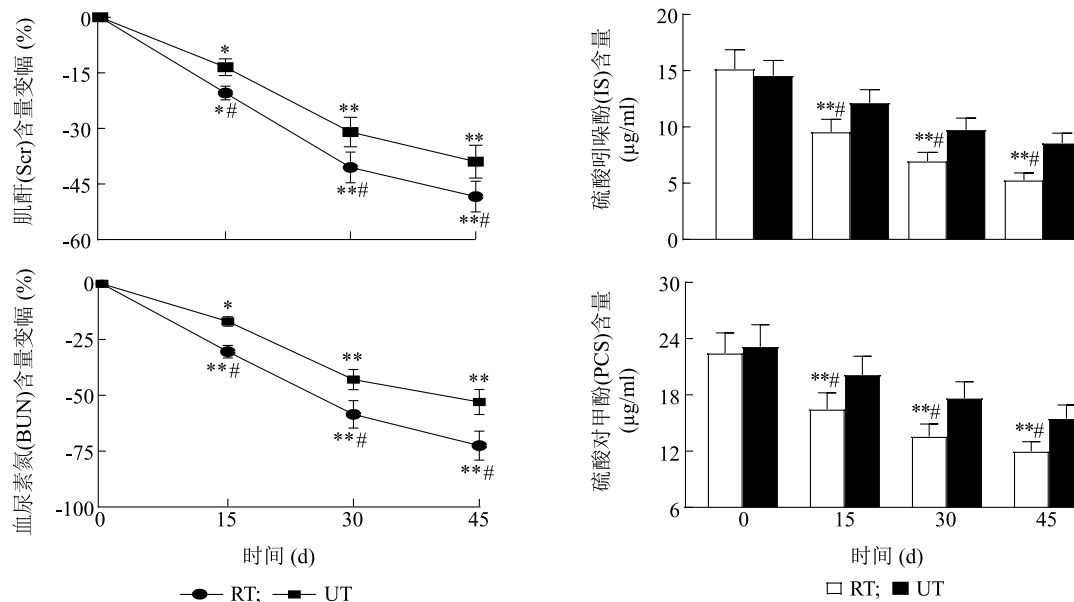
特 征	RT($n=22$)	UT($n=12$)	P 值
肾功能指标			
血清肌酐(Scr)含量($\mu\text{mol/L}$)	198.40 \pm 22.36	185.40 \pm 25.29	0.158
尿素氮(BUN)含量(mmol/L)	47.20 \pm 10.55	42.30 \pm 8.11	0.140
性别			0.724
雄性	13.0/59.1	6.0/50.0	
雌性	9.0/40.9	6.0/50.0	
年龄	6.5 \pm 3.5	7.1 \pm 2.6	0.575
体质量(kg)	8.85 \pm 2.47	8.28 \pm 2.96	0.584
饲养方式			0.610
商品粮	16.0/72.7	9.0/75.0	
自配粮	6.0/27.3	3.0/25.0	
生活环境			0.410
户内	18.0/81.8	11.0/91.7	
户外	4.0/18.2	1.0/8.3	

n :样本数(个);RT 组:大黄素治疗组;UT 组:常规治疗组。

2.2 大黄素对 CRF 患犬肾功能的影响

由图 1 可知:与 0 d 比较,RT 组患犬的 Scr、BUN 含量呈降低趋势,从 15 d 开始有显著差异($P<0.05$),30 d 时差异极显著($P<0.01$),45 d 时分别降低了 48.39%、72.53%;与 UT 组比较,RT 组患犬

在 15 d、30 d 和 45 d 时的 Scr、BUN 含量显著降低($P<0.05$)。RT 组患犬的 IS、PCS 含量从 15 d 开始极显著低于 0 d 时的含量($P<0.01$),45 d 时达到了最低值(分别为 5.26 $\mu\text{g/ml}$ 、11.98 $\mu\text{g/ml}$),并且低于 UT 组($P<0.05$)。



RT:大黄素治疗组;UT:常规治疗组。*表示与 0 d 比较差异显著($P<0.05$),**表示与 0 d 比较差异极显著($P<0.01$),#表示 RT 组与 UT 组在同时间点比较差异显著($P<0.05$)。

图 1 大黄素对慢性肾衰竭(CRF)患犬肾功能指标的影响

Fig.1 Effect of emodin on renal functional indices in dogs with chronic renal failure(CRF)

2.3 大黄素对 CRF 患犬肠道菌群的影响

研究发现,RT 组患犬肠道菌群 OTUs 数量随时间推移明显升高,UT 组患犬肠道菌群 OTUs 数量变化不大(图 2a)。PCA 结果显示,PCA1 可解释 35.52%样本差异,各样本随着试验时间有沿 PCA1 轴右移的趋势,试验后 RT 组样本主要集中于右侧,与其他样本的离散程度较高(图 2b)。在比较不同时间点 OTUs 的差异性时发现,与 0 d 比较,RT 组 15 d 时患犬肠道菌群有 106 个 OTUs 下调,84 个 OTUs 上调(图 2c);30 d 时有 183 个 OTUs 下调,137 个 OTUs 上调(图 2d);45 d 时共有 211 个 OTUs 下调,158 个 OTUs 上调(图 2e)。与 UT 组比较,RT 组有 74 个 OTUs 下调,54 个 OTUs 上调(图 2f)。

2.4 CRF 患犬肠道菌群的 LEfSe 差异分析

通过 LEfSe 分析发现,RT 组患犬肠道在 0 d 时富集的细菌主要有肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、肠杆菌属(Enterobacter)、假单胞菌属(Pseudomonas)、埃希氏菌属

(*Escherichia*)和变形杆菌属(*Proteus*)等;给予大黄素后 45 d,优势菌群发生了显著变化,乳杆菌科(Lactobacillaceae)、普氏杆菌属(*Prevotella*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、丁酸梭菌属(*Butyricicoccus*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)等有益菌数量显著增加,而瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)和优杆菌属(*Eubacterium*)等则富集在 UT 组(图 3a)。将上述各差异菌群不同时期的丰度进行标准化后绘制了聚类热图(图 3b)。可以看出,RT 组的患犬肠道菌群呈现动态变化过程,表现为原富集的菌群丰度逐渐降低,乳杆菌科等有益菌丰度逐渐升高。

2.5 CRF 患犬肠道菌群基因功能 PICRUSt 预测分析

PICRUSt 分析结果(图 4)显示,与 0 d 时(pre-RT)比较,45 d 时 RT 组的患犬肠道菌群在遗传信息处理过程中转录(Transcription)、翻译(Translation)、折叠、分类和降解(Folding, sorting and degrada-

tion)、复制和修复(Replication and repair)等方面以及核苷酸代谢(Nucleotide metabolism)、辅助因子和维生素代谢(Metabolism of cofactors and vitamins)与细胞运动(Cell motility)等代谢途径方面较活跃,而在碳水化合物代谢(Carbohydrate metabolism)、糖生物合成和代谢(Glycan biosynthesis and metabolism)、氨基酸代谢(Amino acid metabolism)等方面参与度较低,与UT组比较也得到了相似的结果。

2.6 大黄素对 CRF 患犬肠道菌群代谢产物的影响

RT组和UT组患犬粪便的乙酸含量在试验过程中无显著变化,但RT组的产乙酸菌群的比例却从15 d开始显著($P<0.05$)高于0 d(图5a、图5e);RT组丁酸含量和产丁酸菌群丰度在15 d、30 d及45 d时均显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)高于0 d和UT组同时时间点(图5b、图5f)。RT组患犬粪便吲哚含量(图5c)、 H_2S 含量(图5d)均呈降低趋势,15 d、30 d及45 d时均极显著低于0 d($P<0.01$)并显著低于同期UT组($P<0.05$);RT组产吲哚菌群OTUs相对丰度逐渐降低,与0 d比较,15 d时有显著差异($P<0.05$),30 d、45 d时有极显著差异($P<0.01$,图5g),试验15 d、30 d及45 d时产 H_2S 菌群OTUs相对丰度也显著低于0 d($P<0.05$,图5h)。

2.7 CRF 患犬粪菌移植对慢性肾衰竭无菌小鼠肾功能的影响

将RT组、UT组治疗前与治疗后的患犬肠道菌群分别移植给慢性肾衰竭无菌小鼠后发现,各组小鼠的Scr、BUN含量均低于灌服粪菌液前,IS与PCS含量均高于灌服粪菌液前,R-Post组IS及PCS含量均低于其他3组($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图6a)。R-Post组Scr、BUN含量降低幅度较大,低于其他3组($P<0.05$,图6b、图6c)。PCA结果显示,各组小鼠样本与供给粪菌液的犬样本较为聚集,与其他犬样本较为分散(图6d),菌群结构也与粪菌液供体相似(图6e)。

3 讨论

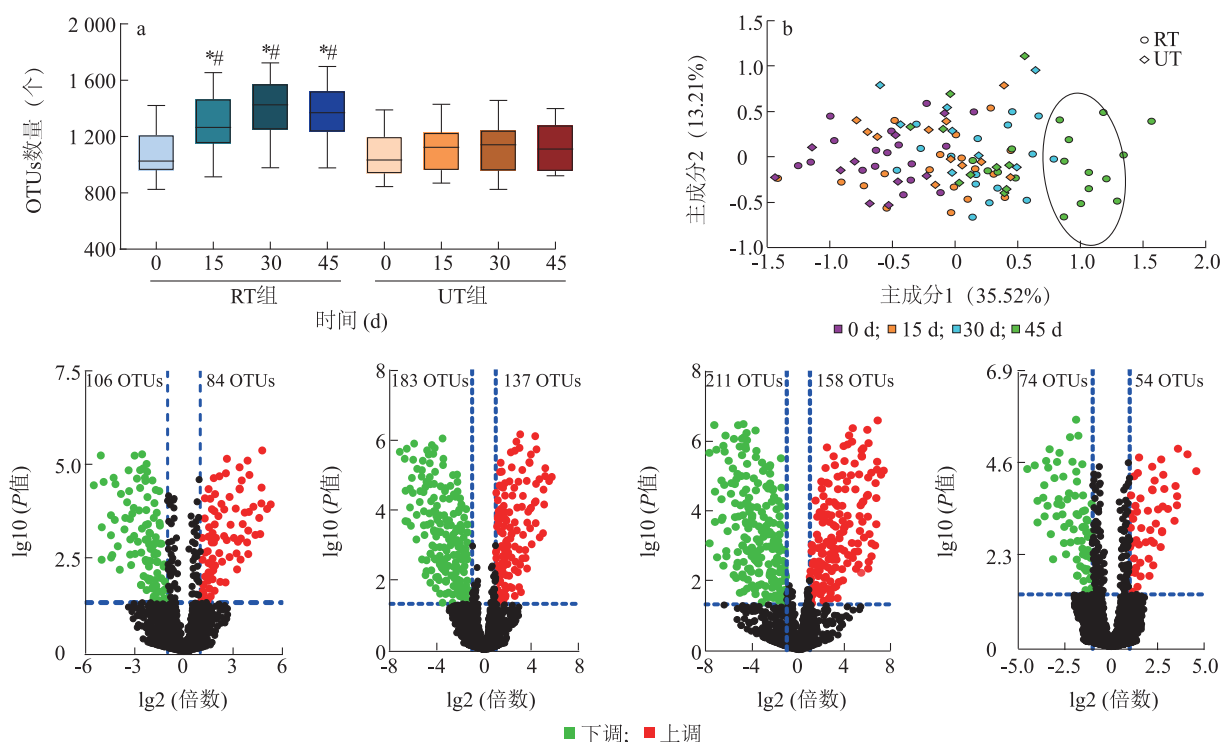
发生慢性肾衰竭时,由于肾小球滤过能力降低,导致肌酐、尿素氮等物质不能顺利经肾排泄而积聚于血液形成氮质血症。本研究结果表明,大黄素可以降低CTF患犬的Scr和BUN含量,效果优于常规治疗组,证实了大黄素对犬CRF具有治疗价值。

随着高通量测序技术的发展,16S rDNA测序技

术已被广泛用于肠道微生物的多样性、物种组成及细菌基因功能预测等方面的定性与定量研究^[16-19]。伦恒忠^[20]通过16S rDNA测序技术研究了慢性肾病进展中肠道菌群的变化情况,寻找到慢性肾病肠道菌群的生物标记物(Biomarker)。Ye等^[21]也利用16S rDNA测序技术找到了肾移植、慢性肾病与健康人的差异菌群。本研究发现,大黄素可以提高CRF犬肠道菌群的丰度,改变菌群结构,说明大黄素对CRF犬肠道菌群具有调节作用;通过LEfSe和PICRUST分析发现,给予大黄素后,乳杆菌科、普氏杆菌属、乳杆菌属、丁酸梭菌属和双歧杆菌属等有益菌数量显著增加,菌群基因在遗传信息处理过程、核苷酸代谢、辅助因子和维生素代谢等代谢途径方面也较为活跃。进一步分析菌群结构与功能的关系,发现大黄素可以提高细菌代谢物丁酸的水平,且与产丁酸细菌丰度增加有关。而有研究结果表明,肠道菌群产丁酸能力降低,引起肠道黏膜通透性增加,导致代谢性内毒素血症和慢性炎症,从而加剧CRF进展^[22]。由此可以推测,产丁酸菌增加可能是大黄素作用机制之一。

IS和PCS是慢性肾脏病及其并发症的独立危险因素,与肾小球滤过率呈负相关^[23]。IS可介导肾小管纤维化相关基因的表达,加速肾损伤,PCS是一种促氧化剂,可使肾的抗氧化能力降低,加重肾组织损伤。而这2种物质是某些肠道细菌的代谢产物,经肠道吸收入血后由肾排泄。本研究发现,给予大黄素后,患犬粪便中吲哚含量及产吲哚菌减少,血液中IS和PCS含量也随之降低。慢性肾衰竭无菌小鼠粪菌移植前的Scr、BUN含量均高于移植后,说明肠道菌群对Scr、BUN含量有调节作用,但移植粪菌液后IS、PCS含量急剧升高,可能是由于可以产生吲哚等前体物的菌群增多有关,而给予大黄素后的粪菌液可明显降低IS、PCS水平。研究结果也为大黄素通过选择性调节肠道菌群改善犬CRF提供了有力证据。

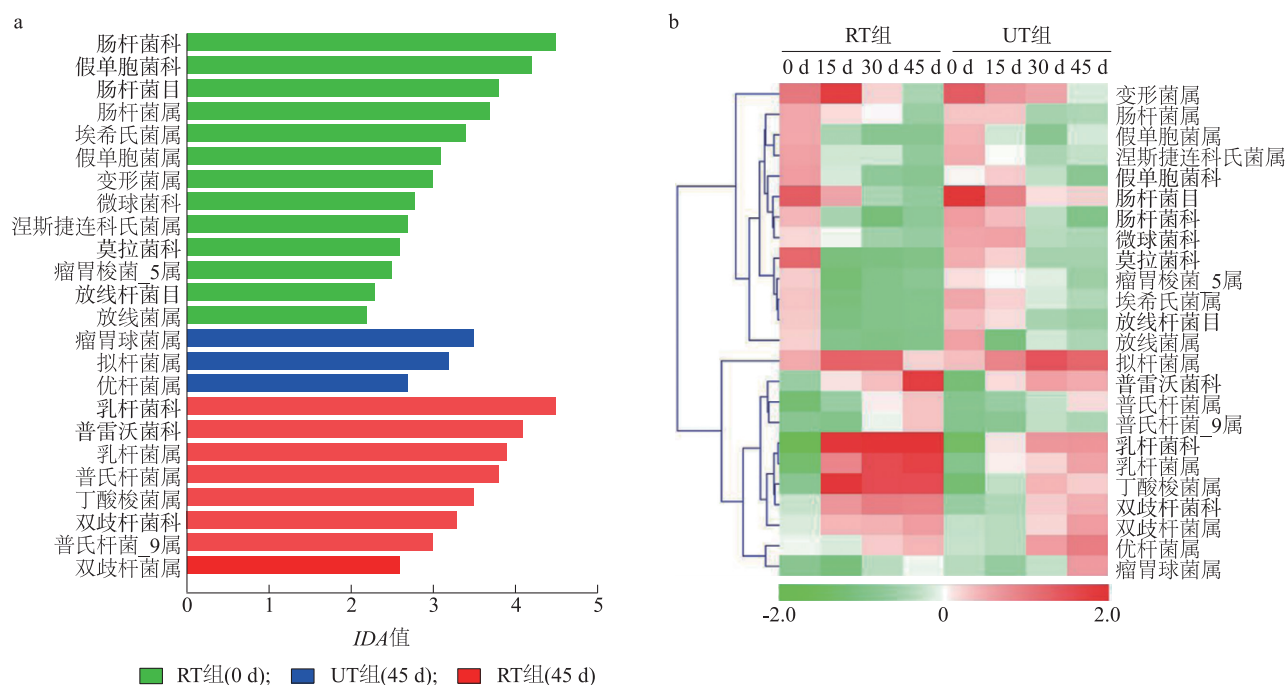
由于样本量较少,本研究仅从时间梯度研究了大黄素选择性调节患犬肠道菌群作用的动态过程,未研究大黄素浓度梯度对患犬肠道菌群的影响,今后将进一步扩增样本量,为本研究提供更多的数据资料。此外,由于16S rDNA测序技术对属以上水平的测试精确度较高,而对细菌种水平的测试精确度较低,所以本研究未涉及细菌种水平的研究。



a: OTUs 数量的变化; b: 主成分分析图; c: RT 组 15 d 时的 OTUs 与 0 d 时比较的变化; d: RT 组 30 d 时的 OTUs 与 0 d 时比较的变化; e: RT 组 45 d 时的 OTUs 与 0 d 时比较的变化; f: RT 组与 UT 组相比在 45 d 时 OTUs 的变化。P<0.05 表示差异倍数>2.0 倍。

图2 大黄素对慢性肾衰竭(CRF)患犬肠道菌群的影响

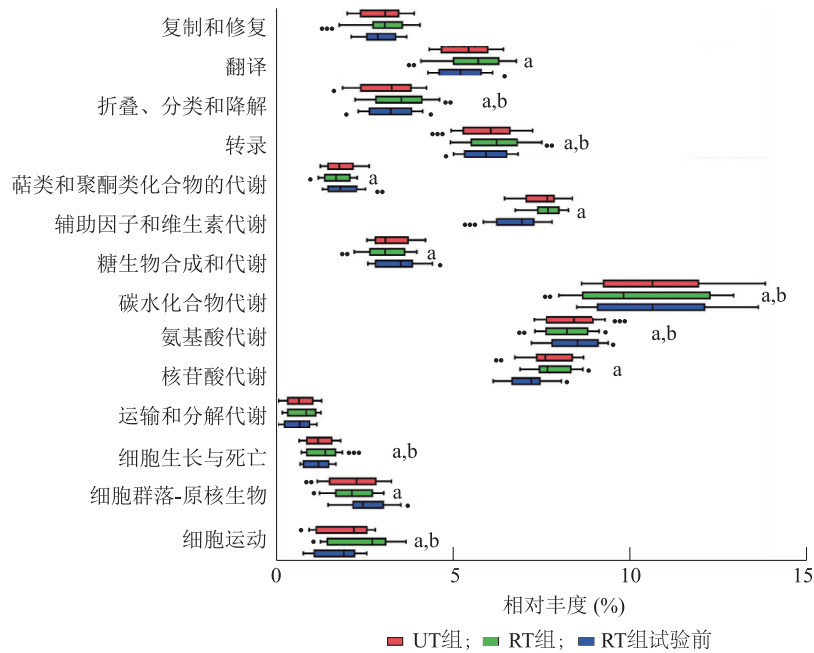
Fig.2 Effect of emodin on the gut microbiota of dogs with chronic renal failure(CRF)



a: 线性判别分析分(LDA 值)柱状图, LDA>2.0 表示有显著差异; b: 菌群聚类热图, 红色表示富集的菌群, 绿色表示减少的菌群。

图3 慢性肾衰竭(CRF)患犬肠道差异菌群分析

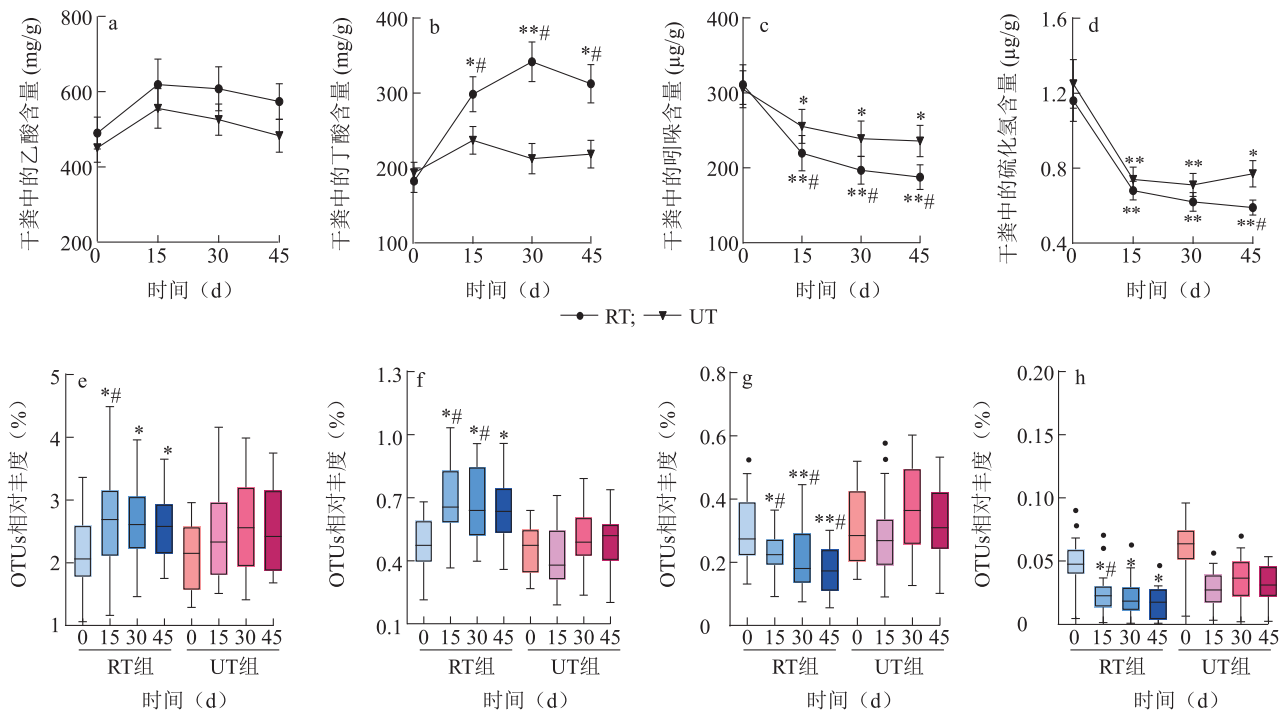
Fig.3 Analysis on differential gut microbiota of dogs with chronic renal failure(CRF)



·: 离散性较大的数值; a: RT 组试验前与试验结束时比较差异显著 ($P < 0.05$); b: 试验结束时 RT 组与 UT 组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

图 4 慢性肾衰竭 (CRF) 患犬肠道微生物功能在 KEGG L1 和 L2 水平代谢途径的比较

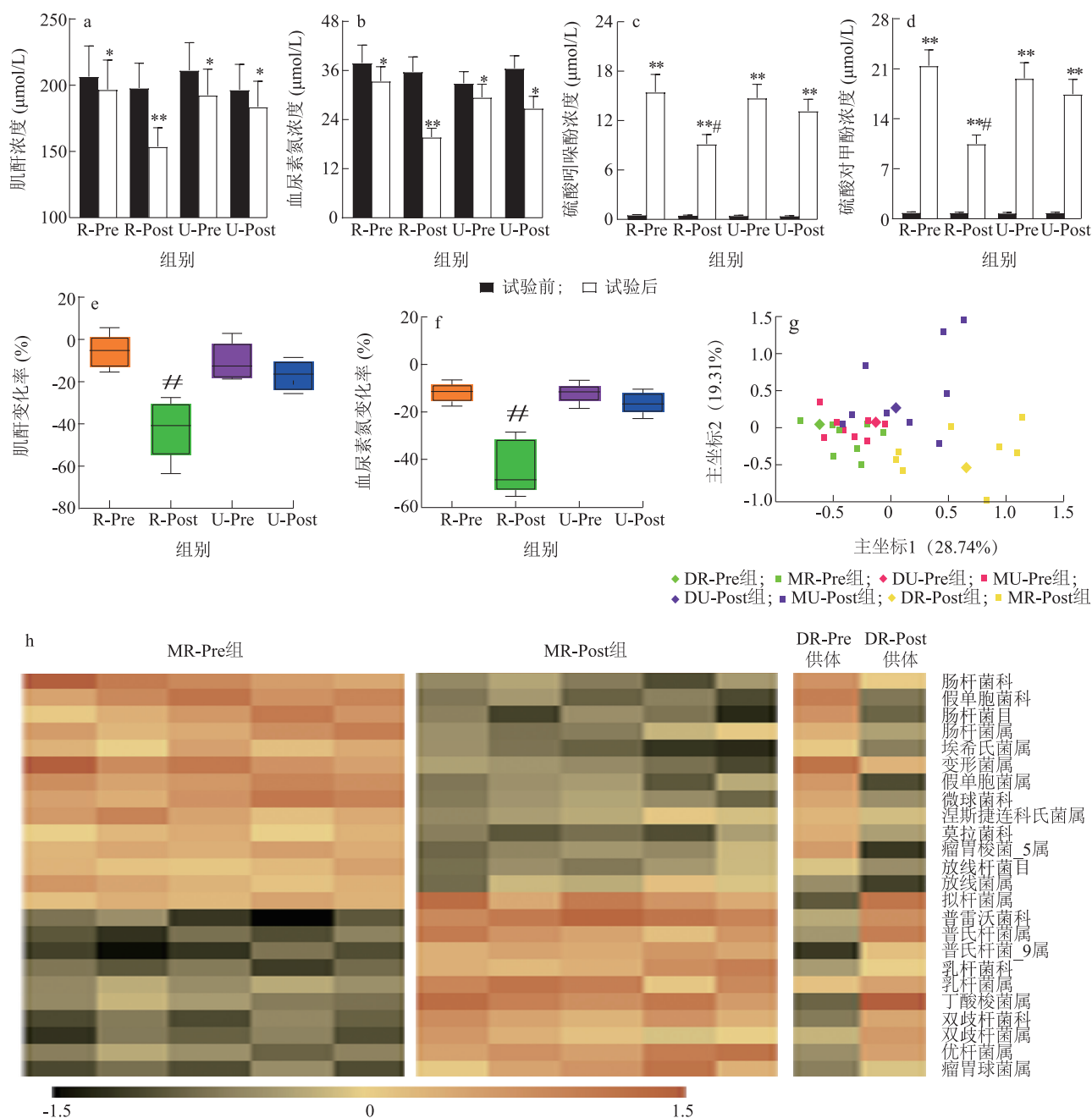
Fig.4 Contrast of microbial functions on L1 and L2 level metabolic pathways of KEGG in the gut of dogs with chronic renal failure (CRF)



a: 犬粪中的乙酸含量; b: 犬粪中的丁酸含量; c: 犬粪中的吲哚含量; d: 犬粪中的硫化氢含量; e: 产乙酸菌群 OTUs 相对丰度; f: 产丁酸菌群 OTUs 相对丰度; g: 产吲哚菌群 OTUs 相对丰度; h: 产硫化氢菌群 OTUs 相对丰度。* 表示与 0 d 比较差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示与 0 d 比较差异极显著 ($P < 0.01$), # 表示与 UT 组同时间点比较差异显著 ($P < 0.05$)。· 表示与中位数离散程度较大的值。

图 5 慢性肾衰竭 (CRF) 患犬粪中代谢产物及其相关肠道菌群的变化

Fig.5 Changes of metabolites and related gut microbiota in feces of dogs with chronic renal failure (CRF)



a: 肌酐浓度; b: 血尿素氮浓度; c: 硫酸吡嗪酚浓度; d: 硫酸对甲酚浓度; e: 肌酐变化率; f: 血尿素氮变化率; g: 主成分分析; h: 菌群分析。U-pre, UT 组试验前; U-post, UT 组试验后; R-pre, RT 组试验前; R-post, RT 组试验后。*、** 分别表示与试验前比较差异显著 ($P < 0.05$)、极显著 ($P < 0.01$), # 表示与其他 3 组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 粪菌移植对慢性肾衰竭无菌小鼠肾功能的影响

Fig.6 Effect of fecal microbiota transplantation on renal functions of sterile chronic renal failure mice

4 结论

综上所述, 大黄素可以通过提高 CRF 患犬肠道中乳杆菌科、普氏杆菌属、乳杆菌属、丁酸梭菌属和

双歧杆菌属等有益菌的丰度, 降低肠杆菌科和假单胞菌科等细菌数量, 从而使肠道菌群代谢物丁酸的含量升高, IS 和 PCS 等有害物质含量降低, 最终改善 CRF 症状。这种对菌群的调节作用, 可为治疗犬

及其他动物的 CRF 提供一种新的生态途径。

参考文献:

- [1] YANG TAO, RICHARDS E M, PEPINE C J, et al. The gut microbiota and the brain - gut - kidney axis in hypertension and chronic kidney disease[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2018, 4: 442-456.
- [2] NISHIYAMA K, AONO K, FUJIMOTO Y, et al. Chronic kidney disease after 5/6 nephrectomy disturbs the intestinal microbiota and alters intestinal motility[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(5): 6667-6678.
- [3] ZHAO L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(9): 639-647.
- [4] KOH A, DE VADDER F, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites[J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1332-1345.
- [5] KASUBUCHI M, HASEGAWA S, HIRAMATSU T, et al. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation[J]. *Nutrients*, 2015, 7(4): 2839-2849.
- [6] 傅兴圣, 陈菲, 刘训红, 等. 大黄化学成分与药理作用研究新进展[J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(16): 1534-1538.
- [7] 李燕, 姚萍, 邓一芸, 等. 大黄对急性坏死性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障及肠道菌群的作用研究[J]. *中华胰腺病杂志*, 2014, 14(2): 128-130.
- [8] 王瑞凤, 雷海燕, 臧璞, 等. 大黄酸对糖尿病小鼠肠道菌群影响的初步研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2016, 28(1): 21-25.
- [9] 温如燕. 通过肠道菌群和 Th17/Treg 细胞探讨大黄牡丹汤治疗炎症性肠病的作用机制[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [10] DOU F, LIU Y T, LIU L M, et al. Aloe-emodin ameliorates renal fibrosis via inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. *Rejuvenation Research*, 2019, 22(3): 218-229.
- [11] HANZLICEK A S, ROOF C J, SANDERSON M W, et al. The effect of Chinese rhubarb, *rheum officinale*, with and without benazepril on the progression of naturally occurring chronic kidney disease in cats[J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2014, 28(4): 1121-1128.
- [12] 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: 1111-1117.
- [13] MICHAEL G, STOCKELMAN J N, LORENZ F N, et al. Chronic renal failure in a mouse model of human adenosine phosphoribosyltransferase deficiency[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 1998, 275: 154-163.
- [14] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. *Genome Biol*, 2011, 12(6): R60. DOI: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
- [15] 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.
- [16] ARCHER S D, MCDONALD I R, HERBOLD C W, et al. Benthic microbial communities of coastal terrestrial and ice shelf Antarctic meltwater ponds[J]. *Front Microbio*, 2015, 6: 485-493.
- [17] CHEN Y, YANG F, LU H, et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2011, 54(2): 562-572.
- [18] 梁晋刚, 刘鹏程, 张秀杰. 基于 16S rDNA 高通量测序技术研究转基因作物对根际细菌群落结构的影响[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(6): 5-8.
- [19] 刘希华, 江丹丹, 文欣. 小飞蓬耐铅内生细菌的分离及其 16S rDNA 鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(4): 260-262.
- [20] 伦恒忠. 慢性肾脏病进展中肠道菌群变化及粪菌移植对慢性肾衰小鼠的影响[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [21] YE G R, ZHOU M J, YU L X, et al. Gut microbiota in renal transplant recipients, patients with chronic kidney disease and healthy subjects[J]. *J South Med Univ*, 2018, 38(12): 1401-1408.
- [22] 王璐璇, 刘玥宏, 朱继开, 等. 短链脂肪酸在疾病治疗中的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2017, 25(13): 1179-1186.
- [23] 成云, 曹学森, 邹建洲. 肠源性尿毒症毒素硫酸对甲酚和硫酸吡啶酚的研究进展[J]. *中国临床医学*, 2015(6): 815-818.

(责任编辑: 张震林)