

无菌动物在人类疾病研究中的应用

邓墨曦¹, 苏宓¹, 周燕霞¹, 张晓梅^{1*}

(1. 四川大学华西基础医学与法医学院, 成都 610065)

摘要: 人体中栖息着数以万亿的微生物, 这些数量庞大且复杂的微生物群被认为是维持机体动态平衡的关键因素, 目前已成为疾病预防、诊断和治疗的新靶点。良好的实验动物模型是研究人类疾病发生发展机制、药物筛选及疗效评价不可或缺的工具。无菌动物因其清晰的微生物背景, 逐渐成为研究宿主与微生物互作机制最有效的动物模型。本综述重点介绍了无菌动物的特征及其在炎症性肠病、肥胖和癌症研究中的应用, 旨在为微生物相关研究开辟一条新途径。

关键词: 无菌动物; 微生物群; 炎症性肠病; 肥胖; 癌症

Application of germ-free animals in human disease research

Deng Zhaoxi¹, Su Mi¹, Zhou Yanxia¹, Zhang Xiaomei^{1*}

(1. West China School of Basic Medical Sciences & Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610065)

Abstract: The human body is home to trillions of microbiota, which are thought to be critical in maintaining homeostasis. The microbiota has become a new target for disease prevention, diagnosis and treatment. Appropriate animal models are indispensable tools for studying the occurrence and development mechanisms of human diseases, drug screening and efficacy evaluation. Due to their clear microbial background, germ-free animals have gradually become the most effective animal model to explore the interaction mechanism between hosts and microbiota. This review focuses on the characteristics of germ-free animals and their application in inflammatory bowel disease, obesity and cancer, aiming to open up a new avenue for microbial-related research.

Keywords: germ-free animals; microbiota; inflammatory bowel disease; obesity; cancer

人体是一个具有生物多样性的动态环境, 栖息着数量庞大且复杂的微生物群, 其与宿主之间的共生关系对维持内环境稳态具有决定性的作用^[1]。越来越多的研究证实, 微生物群的变化和紊乱与各种疾病的发生存在密切关联, 包括肥胖相关疾病、心血管疾病、代谢性疾病、

炎症性肠病和结直肠癌等^[2,3]。无菌动物模型的出现为探究宿主-微生物相互作用机制提供了一条有效途径。无菌动物（germ-free, GF）是指在宿主体内外无可检出一切活的生命体的动物。所谓“无”不是绝对的，即是一定时期内通过现有技术动物体内外的任何部位及生活环境中均无法检测出任何活的动物，包括细菌、真菌、病毒和寄生虫等。

1 无菌动物概况

按照对微生物的控制程度，可以将实验动物分为清洁动物（clean, CL）、无特定病原体动物（specific Pathogen Free, SPF）、无菌动物和悉生动物（gnotobiotics, GN）四个等级(如表 1 所示)。随着生物学技术的进步和发展，无菌动物品种日益丰富，不仅有小鼠、大鼠、豚鼠和家兔等小型无菌动物，也开发出了犬、猪、绵羊和牛等大型无菌动物，甚至还包括媒介生物如苍蝇、白蚁等。悉生动物则是在无菌动物的基础上，选择性的用一种或多种已知微生物定植于无菌动物体内。

表 1 实验动物微生物控制等级分类

等级分类	饲养方法	说明
清洁动物	屏障环境	不携带人畜共患病和主要传染病病原体
无特定病原体动物	屏障环境	无特定的微生物和寄生虫存在
无菌动物	隔离环境	现有技术无法检测出任何微生物
悉生动物	隔离环境	确知携带特定微生物

1.1 无菌动物的特征

无菌动物的理论依据和实践基础源自于胎盘屏障和屏障概念，其在专业设备仪器和严格无菌操作技术的支持下得以生存繁殖。虽然无菌动物外观和普通动物毫无差异，但其形态学和生理学均发生了显著变化。在形态学上，无菌动物消化系统异常的主要表现是盲肠膨大、肠壁薄软和肠绒毛增加。研究发现，无菌小鼠盲肠内黏液和未消化纤维的堆积，使得盲肠体积增大了 4~8 倍^[4]。同时，无菌啮齿类动物的小肠表面积减少，肠蠕动速率降低，肠上皮细胞更新速率减慢。因此，无菌动物也常常因为盲肠扭转或肠壁破裂而导致死亡。在生理学上，无菌动物会出现免疫系统和代谢系统异常。由于肠道内微生物缺失，使得机体对微生物应激性增高、对物质代谢速率降低等，这也导致无菌动物摄取营养物质的能力显著下降。与常规饲养的动物相比，无菌动物详细的形态学和生理学特征如表 2 所示^[5,6]。

表 2 无菌动物形态学和生理学特征

特征	差异
----	----

		肠道总重量减少
		小肠总面积减少、小肠隐窝较浅
		盲肠肿大，肠道肌层薄、张力低
	消化系统	肠黏膜绒毛增多
		肠道蠕动速率降低
		肠上皮的更新率降低
形态学	循环系统	矿物质、维生素吸收能力增强
		心脏缩小、心输出量减少
	血液系统	皮肤、肝脏、肺部和消化道血流量减少
		红细胞数、红细胞压积升高
		白细胞减少，数值恒定
	网状内皮系统	网状内皮细胞功能降低
		肺泡壁变薄
		脾脏缩小，无三级滤泡
	免疫功能	先天性免疫应答减弱
		对微生物感染敏感、应激性增高
		基础代谢率降低，代谢周期长
		肠内容物中无环状或支链脂肪酸
	代谢功能	粪便、盲肠内容物含氮量高
生理学		粪便中胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、转化酶水平升高
		粪便中黏蛋白和黏多糖水平升高
	营养物质	需要额外补充维生素 B 和维生素 K
		肠壁物质交换较慢
	生殖功能	生殖能力下降
	寿命	更长寿

1.2 无菌动物的制备

利用广谱抗生素干预以维持短暂无菌状态的动物被定义为“伪无菌”动物。研究发现抗生素仅能抑制 10%-25% 的肠道微生物，并且抗生素存在潜在的脱靶效应，导致微生物消除效果不稳定、实验重复性差^[7]。无菌动物饲养繁育在无菌屏障系统中，可通过剖宫术将幼仔从子宫内剥离，随后经无菌代乳鼠哺乳或人工乳喂养。另外，像禽类、鱼类、昆虫类等卵生动物，一般在出生后就具备自主采食能力，故只需要对卵进行无菌处理即可获得无菌动物。一旦产生无菌动物，就可以通过杂交无菌个体产生下一个谱系。此后，无菌动物在无菌隔离器中繁育，所有饲料、垫料、饮水和笼具等均须通过高压蒸汽灭菌或者辐照灭菌再经灭菌缸（如图 1A 所示）传入隔离器内部。无菌软包隔离器（如图 1B 所示）通过 2% 过氧乙酸和二氧化氯进行蒸汽灭菌，进出隔离器的空气在正压条件下通过机械过滤的方式滤除粉尘和微生物。对于无菌动物的运输，短距离可采用半封闭式运输罐，长距离则需要使用运输隔离包。

A



B



图1 (A) 灭菌缸 (B) 无菌软包隔离器

1.3 无菌动物的监测

在无菌动物的日常维护中，必须定期对动物的生长状态进行监测，常用的检测方法包括液体培养法、革兰氏染色法和 16S rRNA 基因扩增法。液体培养法和革兰氏染色法一般用于对饲料、垫料、饮水、粪便、动物皮毛和环境混合物的检测，具体操作步骤和检测标准可参照国家标准（无菌动物生活环境及粪便标本的检验方法 GB/T 14926.41-2001）。但每种方法都有各自的局限性，如液体培养法操作复杂且易污染，一些微生物无法进行人工培养也是其弊端所在。革兰氏染色法则可用于筛查不可培养的细菌种类，但其容易受到背景杂质的干扰。另外，革兰氏染色呈阳性也可能是由于样本中存在死细菌所致。无菌状态还可以利用细菌通用引物对粪便样品进行基因扩增来判定。然而，研究者比较上述三种检测方法后发现，PCR 虽然特异性高，但敏感性最低，其检测限约为 10^5 cfu/g 粪便^[8]。同时，超过一个季度或半年需要对动物进行更全面的检测，包括尸体解剖、病毒学、寄生虫等。因此，不断提高和完善检测手段是保证无菌动物质量的必要条件。

2 无菌动物在人类疾病中的应用

虽然已经有大量的研究证实菌群紊乱是导致多种代谢性疾病、自身免疫疾病和炎症性疾病的关键因素，但其背后复杂的调控机制仍不清楚。同时，数量庞大和复杂的微生物群对构建特定疾病的肠道菌群模型造成了阻碍。无菌动物模型的出现为研究宿主与微生物之间的调控机制提供了有效途径。目前，对无菌动物模型的利用主要有以下几种模式：（1）通过比较普通动物与无菌动物的表型或指标差异，探讨肠道微生物群在其中的作用机制；（2）通过移植单菌、混合菌或粪菌，研究特定菌的功能、菌群与宿主互作的机制或重现疾病表型等；（3）通过与遗传工程小鼠结合，探究靶基因与相关菌或菌群的相互作用；（4）从动态的角度观察某一阶段菌群变化与表型变化之间的关系。

2.1 炎症性肠病

炎症性肠病 (inflammatory bowel diseases, IBD) 是一种以菌群紊乱、肠上皮屏障损伤和肠道炎症为特征的慢性疾病, 受到遗传因素、宿主免疫系统和微生物群等外部因素的影响。无菌动物作为具有清晰背景的模式, 可以通过构建人源化菌群小鼠 (human flora-related, HFA) 来研究人类肠道菌群与宿主健康或疾病之间的因果关系。在一项研究中, 借助无菌小鼠动物模型的基础上利用右旋糖酐硫酸钠 (DSS) 构建结肠炎模型, 用于比较健康 (HD) 和溃疡性结肠炎 (UC) 供体对肠道屏障功能的保护差异。研究结果显示, 与 UC+DSS 组相比, HD 干预可以通过提供更多类型的抗炎菌和代谢物来保护肠黏膜屏障, 并通过降低对 DSS 的敏感性来调节细胞因子稳态。有趣的是, UC 细菌也在一定程度上降低了无菌小鼠对 DSS 的敏感性^[9]。在另一项研究中, 将 IBD 供体的微生物菌群转移到无菌小鼠体中, 与健康供体相比增加了肠道 Th17 细胞和 Th2 细胞的数量, 并减少了 ROR γ t Treg 细胞的数量, 这表明 IBD 微生物群定植肠道后加剧了疾病的发展^[10]。将肠易激综合征患者 (irritable bowel syndrome, IBS) 的粪便微生物群移植给无菌小鼠也会引起胃肠道运动的改变, 并诱导对结肠扩张的超敏反应。研究表明其作用机制可能是, 细菌组胺通过 H4 受体依赖性途径导致肠道肥大细胞增生和激活, 从而引发内脏痛觉过敏^[11]。可见, 无菌动物模型为阐明胃肠道疾病发病机制提供了新的见解, 为特定细菌重塑微生物群靶向防治相关疾病提供了理论依据。

2.2 肥胖

长期能量失衡被认为是导致肥胖的主要原因^[12]。后续研究发现一个有趣的现象, 将普通小鼠盲肠微生物群移植到同品系无菌小鼠后, 在连续 14 天减少其进食量的情况下无菌小鼠依然表现出体脂含量增加和胰岛素抵抗的增强, 证明了微生物群能促进肠道对单糖的吸收。同时, 无菌小鼠被移植菌群后, 其空腹诱导脂肪细胞因子的作用被选择性抑制, 导致脂肪细胞中甘油三酯含量增加, 由此可以推测肠道微生物群与机体肥胖存在关联^[13]。随后, Turnbaugh 等人用肥胖小鼠的微生物群定植无菌小鼠, 发现菌群转移会导致受体小鼠的肥胖增加, 这表明肠道微生物群是驱动肥胖表型的因素之一^[14]。Ridaura 等人将肥胖程度不一致的双胞胎微生物群移植至无菌小鼠中, 也发现灌胃肥胖微生物群的小鼠体重显著增加。有趣的是, 将两组小鼠合笼饲养后肥胖小鼠在瘦子小鼠的干扰下阻碍了体重增加和肥胖相关代谢表型的发展^[15]。目前, 已经有研究团队试图通过改变肥胖者的肠道菌群使其体重下降。该团队从四名健康瘦子中获取粪菌进行处理并培养, 随后对 70 名严重肥胖患者进行粪菌移植。实验结果证实, 粪便微生物移植联合低发酵纤维补充剂可以显著改善肥胖患者的胰岛素敏感性, 提高肠道有益菌的多样性, 从而降低血糖、促进新陈代谢, 达到治疗肥胖症的效果^[16]。

2.3 癌症

肺癌、结直肠癌和肝癌被认为是当前最主要恶性肿瘤。无菌小鼠和人源化模型构建的不断发展为探究共生微生物群与癌症免疫治疗之间的因果关系奠定了基础。无菌小鼠免疫系统与普通小鼠存在很多差异，包括 CD4⁺ T 细胞数量减少、产生 IgA 的浆细胞水平降低、肠相关淋巴组织（gut-associated lymphoid tissue, GALT）发育不足、上皮内淋巴细胞减少以及抗菌肽产生减少^[17]。然而，在施用正常微生物群后，无菌小鼠上述被改变的结构和免疫功能得以纠正和恢复，这表明宿主免疫反应与其共生微生物群之间存在复杂的关系。研究者将慢性浅表性胃炎、肠上皮化生或胃癌患者的胃体和胃窦组织以及胃液接种到 C57BL/6 无菌小鼠体内，通过分析胃内微生物群和组织病理学特征发现，来自肠上皮化生或胃癌患者的菌群选择性定植于无菌小鼠胃部并诱导癌前病变^[18]。研究报道，局部微生物群通过激活肺部驻留的 $\gamma\delta$ T 细胞来引发与肺腺癌相关的炎症。从调控机制上来讲，共生菌刺激髓样细胞产生 Myd88 依赖性 IL-1 β 和 IL-23，诱导产生 IL-6 和其他效应分子 V γ 1V δ 17 $\gamma\delta$ T 细胞的增殖和活化，从而促进了炎症和肿瘤细胞增殖。然而，无菌或抗生素治疗的小鼠受到了显著保护，减缓了 *Kras* 突变和 *p53* 丢失诱导的肺癌发展^[19]。由此可见，人源化无菌小鼠是未来精确筛选和评估免疫治疗相关功能性细菌的理想工具。

3 无菌动物的应用现状

从实验动物的角度出发，无菌动物模型在揭示微生物群在疾病发生及发展中的作用机制具有重要意义，包括胃肠道疾病、糖尿病、脂质代谢和癌症治疗^[20-23]。一方面，单菌或混合菌定植小鼠具有可操作性和应用价值，促使无菌动物和悉生动物成为炙手可热的实验动物模型。另一方面，通过生物净化技术使基因工程动物无菌化，比较研究特定基因与微生物之间的互作机制，解析两者对生物个体表型的影响。由此可知，无菌动物模型为探索人源化系统背景下肠道微生物与疾病表型或生物性状之间的因果关系和机制研究开拓了新视野。然而，与其他实验动物一样，无菌动物模型也存在一些局限性：（1）小鼠独特的生理和解剖结构（口腔结构、胃肠道、毛皮和皮肤的区隔化）和行为（食粪）会影响其微生物的组成和结构^[24]；（2）对于人类肠道菌群组成的知识来自对粪便样品的分析，这些微生物数据并不能准确代表不同肠段的具体情况^[25]；（3）难以确定微生物群分布及其代谢紊乱究竟是人类疾病的诱因、促成因素还是疾病发展的结果；（4）无菌动物模型受制于自身体系、专业无菌操作和配套设施设备，导致生产成本和市场售价偏高。

4 展望

近 10 年来, 无菌小鼠已经研发出 C57BL/6J、BALB/c、NCG、ICR 及 BKS-DB 等品系, 为相关科学研究提供了坚实的基础。尽管无菌动物模型存在某些局限性, 但它们仍然是研究微生物群对疾病及健康影响最理想的模式动物。随着微生物基础研究的深入发展、无菌设施的改革创新、微生物检测手段的更新升级, 将有效地推动无菌动物模型向着规模化、多样化、功能化发展。

参考文献:

- [1] IACOB S, IACOB D G, LUMINOS L M. Intestinal Microbiota as a Host Defense Mechanism to Infectious Threats[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 3328.
- [2] CLARKE G, STILLING R M, KENNEDY P J, et al. Minireview: Gut microbiota: the neglected endocrine organ[J]. *Mol Endocrinol*, 2014, 28(8): 1221-1238.
- [3] MARCHESI J R, ADAMS D H, FAVA F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier[J]. *Gut*, 2016, 65(2): 330-339.
- [4] WOSTMANN B S. Germfree and gnotobiotic animal models : background and applications[J]. Informa Healthcare, 1996, : .
- [5] JAIN A, MAURYA A. Germ-free Mice Technology: Opportunity for Future Research. *Gut Microbiome in Neurological Health and Disorders*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022: 271-296.
- [6] AL-ASMAKH M, ZADJALI F. Use of Germ-Free Animal Models in Microbiota-Related Research[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, 25(10): 1583-1588.
- [7] LUNDBERG R, TOFT M F, AUGUST B, et al. Antibiotic-treated versus germ-free rodents for microbiota transplantation studies[J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(1): 68-74.
- [8] FONTAINE C A, SKORUPSKI A M, VOWLES C J, et al. How free of germs is germ-free? Detection of bacterial contamination in a germ free mouse unit[J]. *Gut Microbes*, 2015, 6(4): 225-233.
- [9] YANG Y, ZHENG X, WANG Y, et al. Human Fecal Microbiota Transplantation Reduces the Susceptibility to Dextran Sulfate Sodium-Induced Germ-Free Mouse Colitis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 836542.
- [10] BRITTON G J, CONTIJOCH E J, MOGNO I, et al. Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR γ t(+) Regulatory T

- Cells and Exacerbate Colitis in Mice[J]. *Immunity*, 2019, 50(1): 212-224.e214.
- [11]DE PALMA G, SHIMBORI C, REED D E, et al. Histamine production by the gut microbiota induces visceral hyperalgesia through histamine 4 receptor signaling in mice[J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(655): eabj1895.
- [12]HEYMSFIELD S B, WADDEN T A. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(3): 254-266.
- [13]BäCKHED F, DING H, WANG T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(44): 15718-15723.
- [14]TURNBAUGH P J, LEY R E, MAHOWALD M A, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-1031.
- [15]RIDAURA V K, FAITH J J, REY F E, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice[J]. *Science*, 2013, 341(6150): 1241214.
- [16]MOCANU V, ZHANG Z, DEEHAN E C, et al. Fecal microbial transplantation and fiber supplementation in patients with severe obesity and metabolic syndrome: a randomized double-blind, placebo-controlled phase 2 trial[J]. *Nat Med*, 2021, 27(7): 1272-1279.
- [17]ROUND J L, MAZMANIAN S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(5): 313-323.
- [18]KWON S K, PARK J C, KIM K H, et al. Human gastric microbiota transplantation recapitulates premalignant lesions in germ-free mice[J]. *Gut*, 2022, 71(7): 1266-1276.
- [19]JIN C, LAGOUDAS G K, ZHAO C, et al. Commensal Microbiota Promote Lung Cancer Development via $\gamma\delta$ T Cells[J]. *Cell*, 2019, 176(5): 998-1013.e1016.
- [20]WANG X, WU C, WEI H. Humanized Germ-Free Mice for Investigating the Intervention Effect of Commensal Microbiome on Cancer Immunotherapy[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 37(16-18): 1291-1302.
- [21]CAMPBELL C, KANDALGAONKAR M R, GOLONKA R M, et al. Crosstalk between Gut Microbiota and Host Immunity: Impact on Inflammation and Immunotherapy[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(2).
- [22]ALAM C, BITTOUN E, BHAGWAT D, et al. Effects of a germ-free environment on gut immune regulation and diabetes progression in non-obese diabetic (NOD) mice[J].

Diabetologia, 2011, 54(6): 1398-1406.

- [23]ARON-WISNEWSKY J, WARMBRUNN M V, NIEUWDORP M, et al. Metabolism and Metabolic Disorders and the Microbiome: The Intestinal Microbiota Associated With Obesity, Lipid Metabolism, and Metabolic Health-Pathophysiology and Therapeutic Strategies[J]. Gastroenterology, 2021, 160(2): 573-599.
- [24]KAMAREDDINE L, NAJJAR H, SOHAIL M U, et al. The Microbiota and Gut-Related Disorders: Insights from Animal Models[J]. Cells, 2020, 9(11).
- [25]ECKBURG P B, BIK E M, BERNSTEIN C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. Science, 2005, 308(5728): 1635-1638.