

实验树鼯肠道螺杆菌属细菌特征分析

古文鹏^{①②} 贾杰^① 施梅言^① 邱丹丹^① 阮蕾颖^①
李娜^① 仝品芬^① 代解杰^{①*}

① 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心 昆明 650118;

② 云南省疾病预防控制中心急性传染病防制所 昆明 650022

摘要: 近年来, 树鼯 (*Tupaia belangeri*) 作为一种新型的实验动物被广泛应用于生物医学研究的各个领域。本研究组前期的研究结果显示, 螺杆菌属 (*Helicobacter*) 是树鼯肠道微生物群落中相对丰度最高的一类细菌, 但其具体的细菌种类和结构特征仍然不清楚。因此, 本研究将开展实验树鼯肠道中螺杆菌属细菌的分布种类和特征分析, 为后续实验研究工作提供资料。通过系统采集 72 只树鼯的粪便样本, 提取核酸后采用巢氏 PCR 法应用属特异性引物扩增螺杆菌属特异性片段, 再分别采用 7 个种特异性引物对属特异性阳性样本扩增螺杆菌种特异性片段, 包括肝螺杆菌 (*H. hepaticus*)、家鼠螺杆菌 (*H. muridarum*)、胆汁螺杆菌 (*H. bilis*)、啮齿类螺杆菌 (*H. rodentium*)、弯曲螺杆菌 (*Flexispira rappini*)、鼯螺杆菌 (*H. suncus*) 和盲肠螺杆菌 (*H. typhlonius*)。属特异性引物扩增阳性但种引物扩增阴性的样本进行核酸序列测定和 BLAST 比对分析, 确认其最终所属的螺杆菌种类。结果显示, 72 份树鼯粪便样本中, 属特异性引物扩增阳性有 18 份, 总体阳性率为 25.0%。其中, 盲肠螺杆菌阳性 8 株、胆汁螺杆菌阳性 6 株, 其余 8 份阳性样本经过测序和 BLAST 比对分析后确认为同性恋螺杆菌 (*H. cinaedi*) 阳性 5 株、猫螺杆菌 (*H. felis*) 阳性 2 株和猕猴螺杆菌 (*H. macacae*) 阳性 1 株。有 4 份树鼯粪便样本出现同时携带盲肠螺杆菌和胆汁螺杆菌的情况。将螺杆菌属细菌携带结果与实验树鼯的性别和年龄组进行比较分析后发现, 不同性别间以及不同年龄组间, 属或种阳性样本情况均无差异 ($P > 0.05$)。本研究结果表明, 实验树鼯具有较高的螺杆菌携带率, 且不分性别和年龄, 主要以盲肠螺杆菌、胆汁螺杆菌和同性恋螺杆菌为主。

关键词: 实验树鼯; 盲肠螺杆菌; 胆汁螺杆菌; 同性恋螺杆菌; PCR

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2020) 02-238-09

Analysis of *Helicobacter* spp. in the Gut of Laboratory Tree Shrew

GU Wen-Peng^{①②} JIA Jie^① SHI Mei-Yan^① QIU Dan-Dan^① RUAN Lei-Yin^①
LI Na^① TONG Pin-Feng^① DAI Jie-Jie^{①*}

① *Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and*

Peking Union Medical College, Kunming 650118; ② *Department of acute infectious diseases control and*

prevention, centers for diseases control and prevention of Yunnan province, Kunming 650022, China

基金项目 云南省科技人才和平台计划项目 (No. 2017HC019), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. 3332018162);

* 通讯作者, E-mail: djj@imbcams.com.cn;

第一作者介绍 古文鹏, 男, 博士研究生; 研究方向: 人类疾病动物模型; E-mail: gu_02788@163.com。

收稿日期: 2019-11-01, 修回日期: 2020-02-04 DOI: 10.13859/j.cjz.202002013

Abstract: Currently, the tree shrew has been widely used as an alternative laboratory animal in biomedical researches. Our previous study showed that *Helicobacter* spp. was the most distributed bacteria in gastrointestinal of tree shrew, however, the species of this genus were still unknown. To find out the characteristics of *Helicobacter* spp. species carried in laboratory tree shrew, we performed the current study to provide useful information for future investigation. Seventy-two tree shrew fecal samples were collected, and processed for DNA extraction, nested PCR to amplify specific gene fragments with the genus specific primers. The species-specific primers including those for *Helicobacter hepaticus*, *H. muridarum*, *H. bilis*, *H. rodentium*, *Flexispira rappini*, *H. suncus* and *H. typhlonius* were used to amplify species-specific fragments from genus-positive samples. The samples negative for species-specific primers but positive for genus primer were sent for sequencing. BLAST and alignment methods were used to confirm their *Helicobacter* species. The results showed that eighteen feces were positive for *Helicobacter*, and the positive rate was 25%, among which eight strains were *H. typhlonius*, six were *H. bilis*, five were *H. cinaedi*, two were *H. felis* and one was *H. macacae* (Fig. 1). Four cases were mixed carrying both *H. typhlonius* and *H. bilis*. The carried *Helicobacter* genus and species had no statistical significance in tree shrew among different gender and age groups ($P > 0.05$) (Table 2). The highly carried rate of *Helicobacter* spp., mainly *H. typhlonius*, *H. bilis* and *H. cinaedi*, was found in laboratory tree shrew with different genders and ages.

Key words: Laboratory tree shrew; *Helicobacter typhlonius*; *H. bilis*; *H. cinaedi*; PCR

近年来, 树鼩 (*Tupaia belangeri*) 作为一种新型的实验动物被广泛应用于生物医学研究的各个领域, 包括人类感染性疾病模型的建立和研究、脑部发育、眼科疾病、老龄化、抑郁和应激等方面 (Chen et al. 2019)。实验树鼩因其体型小、繁殖周期短、饲养成本低以及与人类基因组相似程度高等特点, 被认为是非人灵长类实验动物的一个重要替代者 (Lu et al. 2018)。本课题组前期对实验树鼩肠道微生物群落和共生菌群的研究结果显示, 螺杆菌属 (*Helicobacter*) 是树鼩肠道微生物群落中相对丰度最高的一类细菌, 但其具体的细菌种类和结构特征仍然不清楚 (Gu et al. 2019)。

螺杆菌属是一类革兰氏染色阴性, 微需氧条件下才能生长, 并且营养要求较高的细菌。根据其在宿主肠道中定植部位的不同, 目前将螺杆菌分为胃内螺杆菌 (gastric *Helicobacter*) 和肠肝螺杆菌 (enterohepatic *Helicobacter*) (Bohr et al. 2006)。既往对于螺杆菌属感染实验动物的研究主要集中在啮齿类动物方面, 几

乎没有涉及实验树鼩。研究结果表明, 螺杆菌属细菌在啮齿类实验动物中具有较高的感染率并主要以隐性携带形式存在, 动物一旦出现免疫缺陷则可引起严重的临床症状, 严重影响实验动物的质量控制要求以及实验结果 (Goto et al. 2004, Johansson et al. 2006, Duangchanchot et al. 2014)。因此, 螺杆菌属细菌的检测已经成为国外实验动物健康监测的一个必检项目, 同时, 我国也颁布了实验动物中螺杆菌 PCR 检测方法的标准 (T/CALAS24-2017)。

因螺杆菌属细菌的生长条件比较苛刻, 限制了分离培养法在螺杆菌诊断检测中的应用。随着分子生物学的发展, PCR 检测技术因快速、高效、准确而被广泛应用于检测螺杆菌 (Beckwith et al. 1997, Feng et al. 2005)。基于上述研究现状和基础, 本研究通过系统采集实验树鼩粪便, 采用 PCR 扩增和序列测定技术探讨其肠道菌群中螺杆菌属细菌的组成和分布特征, 为后续树鼩相关实验动物模型的建立和应用提供资料。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物

采集本实验室繁殖的健康普通级中缅树鼩粪便样本 72 份。树鼩平均年龄为(16.85 ± 13.79) 月,同时将其分为 4 个年龄组。婴儿组 25 只(7 个月以下)、青年组 21 只(8 ~ 18 个月)、中年组 19 只(19 ~ 42 个月)和老年组 7 只(大于 43 个月)。所有树鼩的体重在 118 ~ 160 g 之间,其中雄性 37 只,雌性 35 只,由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心提供【SCXK(滇)K2018-0002】。实验动物的使用和实验遵循 3R 和福利伦理原则。

采用无菌棉签拭子采集每只树鼩新鲜粪便样本于无菌大便盒中,立即放入 - 80 °C 冰箱,冷冻保存。实验过程未对树鼩进行创伤性操作和处死。

1.2 方法

1.2.1 粪便 DNA 样本的提取 按照粪便基因组 DNA 核酸提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)操作说明进行树鼩粪便样本的核酸提取。采集的树鼩粪便置室温溶解后,每份粪便样本取 200 mg 至 2 ml 离心管中,对粪便进行加热、吸附等操作,最后以 50 μl TE 洗脱缓冲液溶解粪便基因组 DNA,置于 - 20 °C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增和检测 按照参考文献(Goto et al. 2000, Wu et al. 2017)和标准(T/CALAS24-2017, 中国实验动物协会 2017)设计并合成引物(硕擎生物科技有限公司,昆明),进行 PCR 扩增和检测(表 1)。螺杆菌属特异性引物检测采用巢氏 PCR 法进行,第一轮扩增采用 HB-1st 引物,第二轮扩增采用 HB-2nd 引物,以第一轮扩增产物稀释 10 倍作为第二轮扩增的模板进行。PCR 扩增体系为 20 μl,其中 Premix Taq (Takara, 日本) 10 μl, 无酶水(Ambion, 美国) 8 μl, 上下游引物各 0.5 μl, 模板 DNA 1 μl (20 mg/L)。扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环;

最后 72 °C 10 min。扩增产物以 1.5%的琼脂糖凝胶(Biowest, 西班牙)进行电泳, Goldview 核酸染料(Solarbio, 中国)染色,凝胶成像仪(GelDoc 2000, Bio-Rad, 美国)判定结果。

对螺杆菌属特异性引物扩增为阳性的样本,再采用种特异性引物进行 PCR 扩增,检测种类包括肝螺杆菌(*H. hepaticus*)、家鼠螺杆菌(*H. muridarum*)、胆汁螺杆菌(*H. bilis*)、啮齿类螺杆菌(*H. rodentium*)、弯曲螺杆菌(*Flexispira rappini*)、鼯螺杆菌(*H. suncus*)和盲肠螺杆菌(*H. typhlonius*)。PCR 扩增体系和条件同上,若出现螺杆菌属特异性引物扩增阳性,但种中的任意一个引物扩增为阴性,则将螺杆菌属特异性阳性产物送昆明硕擎生物公司进行序列测定。测序结果经过 BLAST 比对后,选取与序列相似度大于 98%的参考菌株和序列进行 alignment 比对及聚类分析,确认具体的螺杆菌细菌种类。

1.2.3 统计学和生物信息学分析 采用 SPSS17.0 统计软件对检测结果进行统计学分析,定量变量用平均值 ± 标准差表示。不同的样本因素与检测结果采用卡方检验进行分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

Lasergene 软件对序列测定结果进行拼接、MEGA6.0 对所有测序结果和参考序列进行 alignment 比对,以邻位相连算法(neighbour-joining method)(自引导值 Bootstrap: 1 000 次重复抽样 replicates)构建聚类树。

2 结果

2.1 树鼩肠道螺杆菌属分析

72 份树鼩粪便样本中,螺杆菌属特异性引物扩增阳性的样本有 18 份,总体阳性率为 25.0%。在所有的种特异性引物扩增检测结果中,盲肠螺杆菌(*H. typhlonius*)阳性有 8 株、胆汁螺杆菌(*H. bilis*)阳性有 6 株,其余 8 份阳性样本经过测序和 BLAST 比对分析后确认为同性恋螺杆菌(*H. cinaedi*)阳性 5 株、猫螺杆菌(*H. felis*)阳性 2 株和猕猴螺杆菌(*H.*

macacae) 阳性 1 株 (图 1)。在所有的阳性样本中, 有 4 份树鼩粪便样本同时携带了盲肠螺

杆菌和胆汁螺杆菌, 为混合携带。PCR 扩增和电泳结果如图 2 所示。

表 1 螺杆菌属和种 PCR 检测引物

Table 1 The genus and species primers of *Helicobacter* in this study

	引物名称 Primer	序列 Sequence (5'-3')	长度 Length (bp)	参考文献 Reference
属特异性引物 (第 1 轮) Genus specific (nested PCR 1st)	HB-1st-F	CTATGACGGGTATCCGGC	780	Goto et al. 2000
	HB-1st-R	CTCAGACACGAGCTGAC		
属特异性引物 (第 2 轮) Genus specific (nested PCR 2nd)	HB-2nd-F	AGGGAATATTGCTCAATGGG	350	
	HB-2nd-R	TCGCCTTCGAATGAGTATT		
肝螺杆菌 <i>H. hepaticus</i>	hep-F	GAAACTGTTACTCTG	405	
	hep-R	TCAAGCTCCCGAAGGG		
家鼠螺杆菌 <i>H. muridarum</i>	mur-F	GAAACTATTAGTCTA	409	
	mur-R	TTTCAAGCTCCACAGAAGTG		
胆汁螺杆菌 <i>H. bilis</i>	bil-F	CAGAACTGCATTTGAAACTAC	418	
	bil-R	AAGCTCTGGCAAGCCAGC		
啮齿类螺杆菌 <i>H. rodentium</i>	rod-F	TTGCGAGGCTTGTCCTTG	324	
	rod-R	TTAGAGTGCTCTACCGAATA		
弯曲螺杆菌 <i>F. rappini</i>	rap-F	GAAACTGACCATCTA	407	
	rap-R	TCAAGCTCTGGCAAGCC		
鼯螺杆菌 <i>H. suncus</i>	sun-F	GGGTAAAATCCGTAGAGATC	358	
	sun-R	TCAAGGTCTAGTAACTAGAC		
盲肠螺杆菌 <i>H. typhlonius</i>	typ-F	GAGAGAAGATTATGACGGTATC	150	Wu et al. 2017
	typ-R	CAGGATTTACATCTGACTTAC		

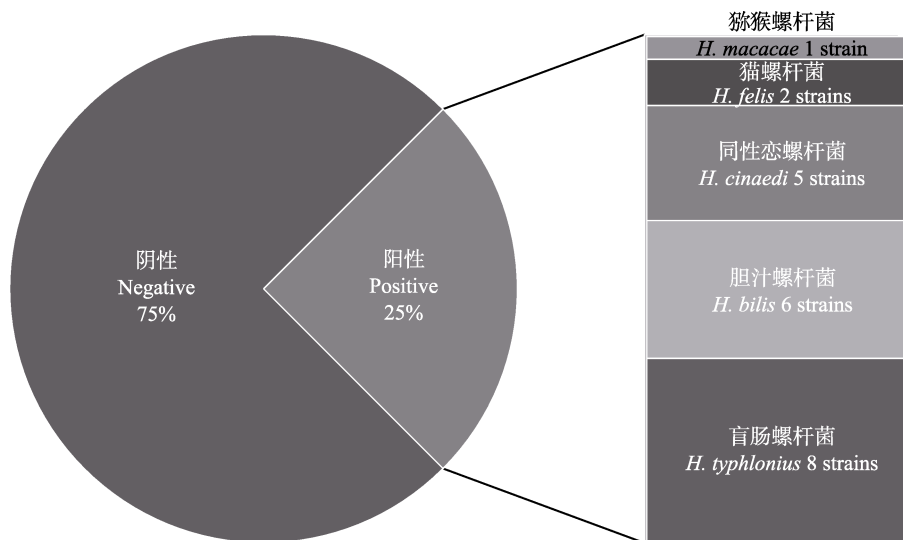


图 1 树鼩肠道螺杆菌细菌检测结果

Fig. 1 The results of *Helicobacter* detection

左图为样本检测阳性率; 右图为所有阳性样本螺杆菌种检测结果。

The left figure showed total positive results; the right figure showed all the species results of *Helicobacter* detection.

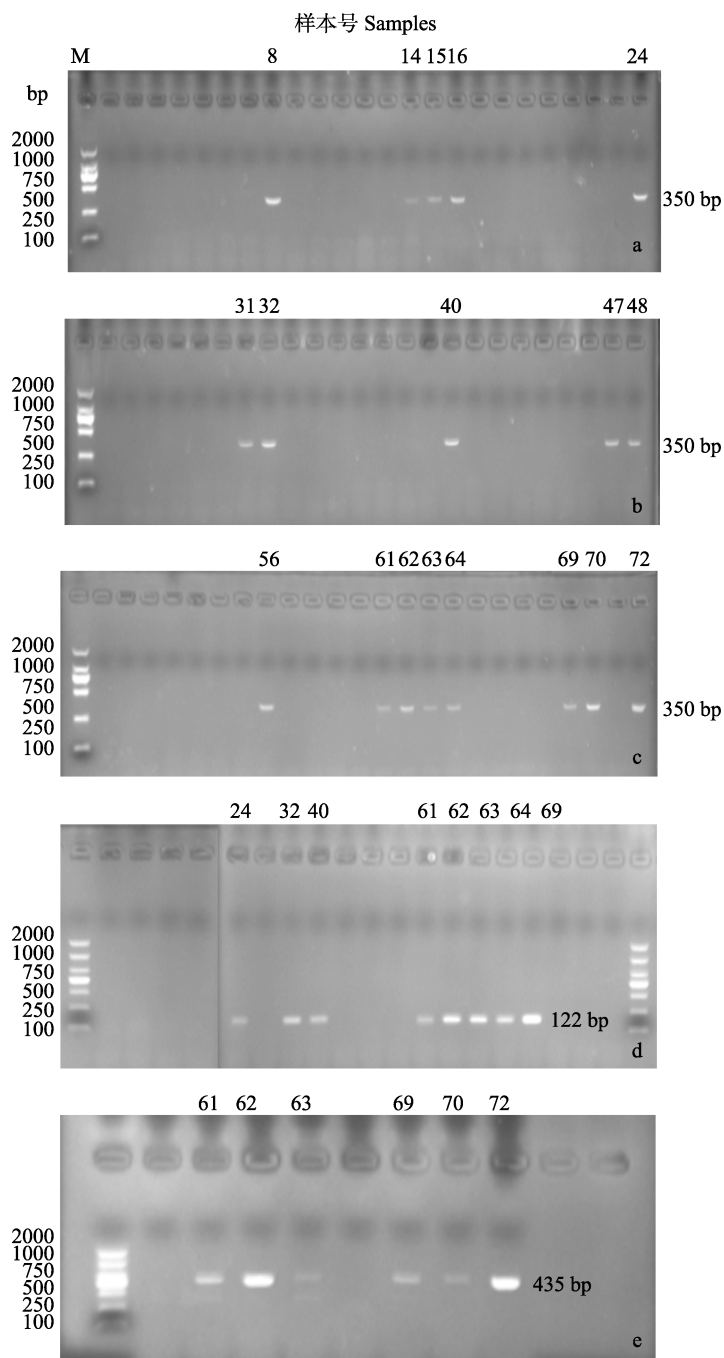


图 2 PCR 扩增电泳结果

Fig. 2 PCR detection results

a ~ c. 螺杆菌属特异性引物扩增电泳结果；d. 盲肠螺杆菌扩增电泳结果；e. 胆汁螺杆菌扩增电泳结果；阳性样本编号标注在图上；M. DL2000 DNA 分子量标准（TaKaRa）。

a - c. The electrophoresis results of *Helicobacter* detection: the positive samples were marked in the figure; d. The electrophoresis results of *H. typhlonius*: the positive samples were marked in the figure; e. The electrophoresis results of *H. bilis* results: the positive samples were marked in the figure. M. DL2000 DNA Marker (TaKaRa).

8 份螺杆菌属特异引物阳性样本, 经过与参考菌株序列进行比对和聚类后发现, 5 株与同性恋螺杆菌在同一个聚类群中, 即 YNTS-H8、YNTS-H14、YNTS-H16、YNTS-H31 和 YNTS-H48, 2 株与猫螺杆菌在同一个聚类群, 即 YNTS-H15 和 YNTS-H56, 1 株与猕猴螺杆菌在同一个聚类群, 即 YNTS-H47 (图 3)。

BLAST 比对分析结果显示, 螺杆菌属特异性引物扩增目的片段为细菌 16S rRNA 基因 310 ~ 599 nt 部分。对 8 株螺杆菌属特异性阳性样本 alignment 分析结果表明, 仅 YNTS-H14 菌

株在 369 nt 位置插入 G, 其余菌株未发现碱基插入或缺失 (图 4)。菌株发生核苷酸点突变的位置主要集中在 347 ~ 495 nt 和 515 ~ 559 nt 位置两个部分, 且主要发生的是碱基的转换和颠换。

2.2 螺杆菌携带与实验树鼩相关性分析

将螺杆菌属细菌检测结果与实验树鼩的性别和年龄组进行比较分析后发现, 无论是螺杆菌属阳性, 还是种特异性阳性样本, 二者在树鼩年龄组中的分布均无差异 ($P > 0.05$, 表 2)。同样的, 螺杆菌的携带在雄性和雌性实验树鼩中的分布也无统计学差异 ($P > 0.05$, 表 2)。

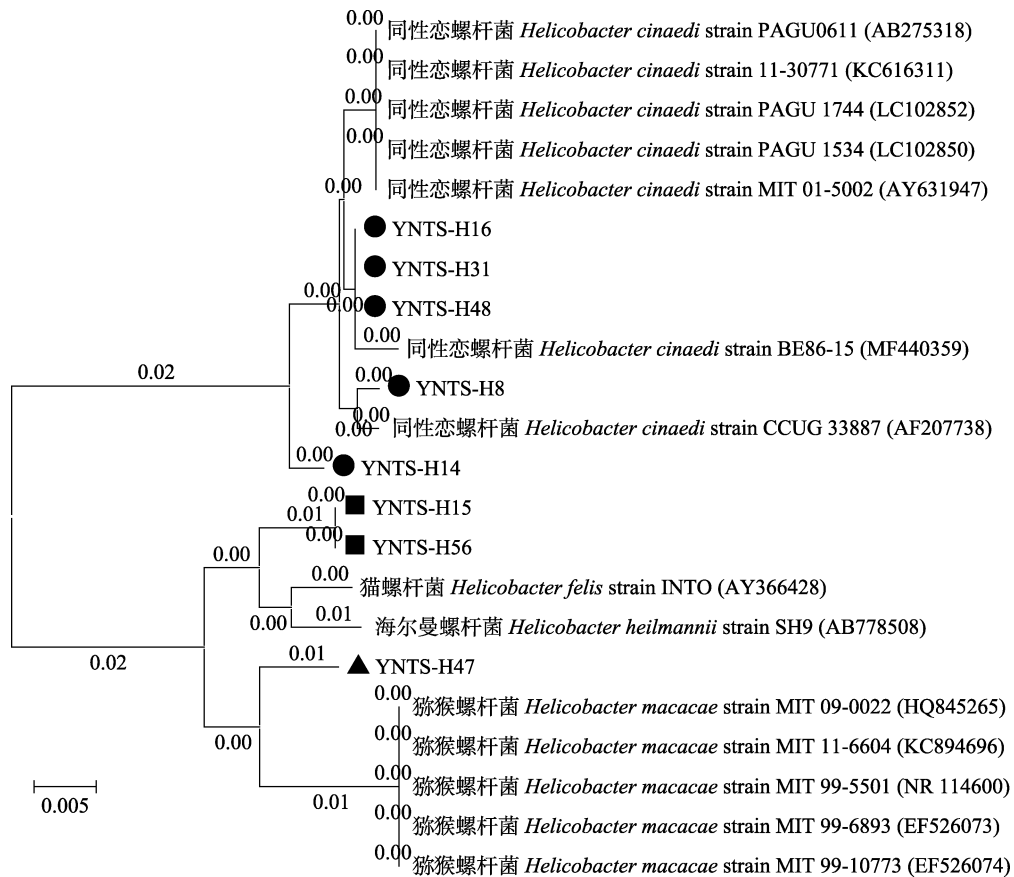


图 3 8 株螺杆菌属阳性样本序列比对和聚类树

Fig. 3 The alignment and phylogenetic tree of eight *Helicobacter* genus positive samples

每个参考菌株的 GenBank 登录号见菌株名称后面的括号内; 圆圈表示菌株与同性恋螺杆菌属于同一聚类群、方框表示菌株与猫螺杆菌属于同一聚类群、三角形表示与猕猴螺杆菌属于同一聚类群; 各支上的数据和标尺数据表示两者之间的距离。

The GenBank accession numbers for each reference strain were shown in the brackets; circle indicated the strains clustered with *H. cinaedi*, square indicated the strains clustered with *H. felis*, and triangle indicated the strain clustered with *H. macacae*. The numbers in each branches and scale indicated the distances between groups.

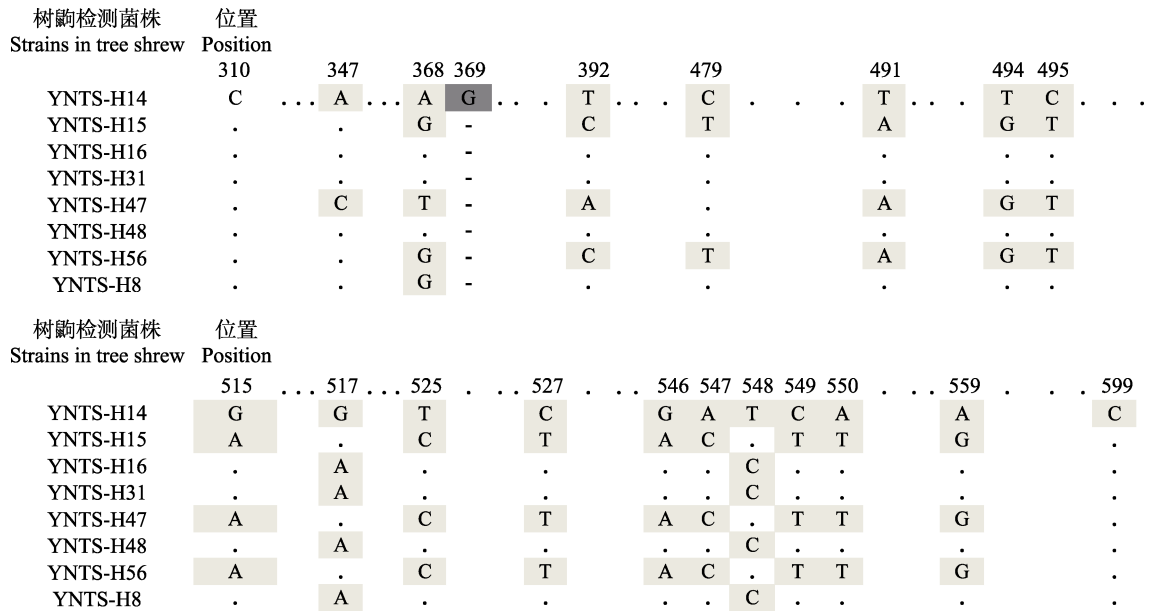


图 4 8 株螺杆菌属特异阳性样本序列 alignment 比对分析

Fig. 4 The alignment results among eight *Helicobacter* genus positive samples

浅灰色表示出现碱基突变的位置；深灰色表示出现碱基插入的位置；图中的点表示相同的核苷酸；图中的短横线表示在此位置其他菌株出现碱基缺失。

The light grey indicated the mutate position; the dark grey indicated the base insertion; the point of the figure indicated the identical nucleotide; the short line indicated the base deletion of other strains.

表 2 螺杆菌的检测结果与实验树鼩年龄和性别相关性分析

Table 2 The correlation analysis of *Helicobacter* detection results in tree shrew with different ages and genders

螺杆菌属或种 <i>Helicobacter</i> genus or species	年龄组 Age groups				χ^2	P	性别 Gender		χ^2	P	
	婴儿 Infant	青年 Young	中年 Middle	老年 Senile			雄性 Male	雌性 Female			
螺杆菌属 <i>Helicobacter</i> genus	阳性 Positive	7	3	4	4	5.421	0.143	8	10	0.463	0.496
	阴性 Negative	18	18	15	3			29	25		
盲肠螺杆菌 <i>H. typhlonius</i>	阳性 Positive	3	1	2	2	3.044	0.385	5	3	0.445	0.505
	阴性 Negative	22	20	17	5			32	32		
胆汁螺杆菌 <i>H. bilis</i>	阳性 Positive	2	0	3	1	3.620	0.306	2	4	0.854	0.355
	阴性 Negative	23	21	16	6			35	31		
同性恋螺杆菌 <i>H. cinaedi</i>	阳性 Positive	1	2	1	1	1.219	0.749	2	3	0.279	0.597
	阴性 Negative	24	19	18	6			35	32		
猫螺杆菌 <i>H. felis</i>	阳性 Positive	1	0	0	1	4.714	0.194	1	1	0.002	0.968
	阴性 Negative	24	21	19	6			36	34		
猕猴螺杆菌 <i>H. macacae</i>	阳性 Positive	1	0	0	0	1.906	0.592	0	1	1.072	0.300
	阴性 Negative	24	21	19	7			37	34		

3 讨论

本研究组对于实验树鼩肠道宏基因组的前期研究发现，不同年龄、性别的实验树鼩之间肠道菌群的组成和菌群相对丰度变异非常明显，其中年龄是影响肠道菌群特征最主要的因素（Gu et al. 2019）。杨学芳等（2019）也对实验树鼩的肠道菌群进行了探究，但其研究仅采集了 3 只动物的粪便样本，其结果以埃希氏杆菌属（*Escherichia*）、乳酸菌属（*Lactobacillus*）和肠球菌属（*Enterococcus*）为优势菌群。但是本研究的前期研究对更多样本（73 个个体）的分析结果来看，实际上树鼩的肠道菌群还是以螺杆菌属占主要地位。

螺杆菌是引起慢性活动性胃炎和胃溃疡的病原菌，同时也被认为是引起胃癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的 I 级致癌物，特别是幽门螺杆菌（*H. pylori*）对于人类的感染，给社会发展造成了极大的疾病负担。研究发现，在许多动物肠道内都分离或鉴定出了不同种类的螺杆菌属细菌，包括肝螺杆菌、胆汁螺杆菌、同性恋螺杆菌和盲肠螺杆菌等（Eaton et al. 1996, Goto et al. 1998）。通过对不同的野生动物、实验动物和宠物等宿主的研究发现，螺杆菌在宿主动物胃肠道中是普遍存在的，这些螺杆菌通常定植在动物的胃肠道内，不产生典型的临床症状，但会对部分免疫缺陷的动物产生致病性（Barthold et al. 1993, Haines et al. 1998, Bracken et al. 2017）。鉴于螺杆菌对于实验动物的感染会产生致病性，影响动物质控，干扰实验结果，同时可能对实验研究人员具有潜在的危害性，因此，国内外对于实验动物的螺杆菌检测和研究工作十分重视。

中国实验动物协会于 2017 年 5 月颁布了我国实验动物螺杆菌 PCR 检测方法（T/CALAS 24-2017）。该标准中规定了几类重要的螺杆菌种的 PCR 检测方法和步骤，包括肝螺杆菌、胆汁螺杆菌、啮齿类螺杆菌、家鼠螺杆菌和盲肠螺杆菌等。这些螺杆菌种是在以啮齿类为主的

实验动物中最主要的细菌种类。然而，目前尚未有关于实验树鼩中螺杆菌携带特征和分布状态的系统研究。鉴于树鼩在生物医学研究领域的应用愈加广泛，探讨其螺杆菌携带特点具有重要的指导作用和研究意义。

既往对于实验动物螺杆菌的检测和研究工作主要集中在啮齿类动物方面，例如：已有文献报道在实验小鼠（*Mus musculus*）中鉴定了 11 个螺杆菌种，其中包括肝螺杆菌、胆汁螺杆菌、啮齿类螺杆菌、鼠螺杆菌和盲肠螺杆菌等；仓鼠（*Cricetinae*）感染的螺杆菌主要有同性恋螺杆菌、胆汁螺杆菌等；而在诸如猫（*Felis*）、狗（*Canis*）和猕猴（*Macacae*）等动物中也相继发现了猫螺杆菌（*H. felis*）、狗螺杆菌（*H. canis*）和猕猴螺杆菌（*H. macacae*）等（Taylor et al. 2007, Sheh et al. 2014）。Goto 等（2000）采用巢氏 PCR 法检测小鼠、大鼠（*Rattus norvegicus*）、沙鼠（*Meriones*）和鼯类粪便样本中的螺杆菌感染情况，结果显示肝螺杆菌、胆汁螺杆菌、啮齿类螺杆菌和盲肠螺杆菌在上述实验动物中检出，同时，部分感染螺杆菌的小鼠肝出现病变。本研究结果显示，实验树鼩中具有较高螺杆菌携带率，同时存在混合携带的情况。在携带的螺杆菌属中，主要以盲肠螺杆菌、胆汁螺杆菌和同性恋螺杆菌为主要种类。此外，一些比较少见的螺杆菌种，如猫螺杆菌和猕猴螺杆菌也在树鼩的粪便中被发现。螺杆菌在不同年龄和性别的树鼩中检出率无统计学差异，普遍存在于各个年龄段和不同性别的实验树鼩中。本研究前期的树鼩肠道宏基因组分析结果中，螺杆菌属细菌在实验树鼩婴儿组和青年组中的相对丰度最高，而在老年组中相对丰度较低（Gu et al. 2019）。但在本研究中发现，无论是属还是种的螺杆菌细菌在各个实验树鼩年龄组中的分布是无统计学差异的。其原因可能涉及不同的检测方法的敏感性、动物的选取和不同的实验树鼩各自携带情况不同。然而，对于实验树鼩肠道螺杆菌属细菌总体分布特征和携带情况，两项研究结果之间是相互呼应的。本

研究结果提示, 螺杆菌的携带状态应该在后续以树鼩作为实验动物的研究中加以重视。

参 考 文 献

- Barthold S W, de Souza M S, Janotka J L, et al. 1993. Chronic Lyme borreliosis in the laboratory mouse. *American Journal of Pathology*, 143(3): 959–971.
- Beckwith C S, Franklin C L, Hook R R, et al. 1997. Fecal PCR assay for diagnosis of *Helicobacter* infection in laboratory rodents. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6): 1620–1623.
- Bohr U R, Selgrad M, Ochmann C, et al. 2006. Prevalence and spread of enterohepatic *Helicobacter* species in mice reared in a specific-pathogen-free animal facility. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3): 738–742.
- Bracken T C, Cooper C A, Ali Z, et al. 2017. *Helicobacter* infection significantly alters pregnancy success in laboratory mice. *Journal of American Associated Laboratory Animal Science*, 56(3): 322–329.
- Chen L, Gu W, Liu C, et al. 2019. Characteristics of the tree shrew gut virome. *PLoS One*, 14(2): e0212774.
- Duangchanchot M, Inpunkaew R, Thongsiri P, et al. 2014. Prevalence of *Helicobacter* in laboratory mice in Thailand. *Experimental Animal*, 63(2): 169–173.
- Eaton K A, Dewhirst F E, Paster B J, et al. 1996. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12): 3165–3170.
- Feng S, Ku K, Hodzic E, et al. 2005. Differential detection of five mouse-infecting *Helicobacter* species by multiplex PCR. *Clinical Diagnose Laboratory Immunology*, 12(4): 531–536.
- Goto K, Jiang W, Zheng Q, et al. 2004. Epidemiology of *Helicobacter* infection in wild rodents in the Xinjiang-Uygur autonomous region of China. *Current Microbiology*, 49(3): 221–223.
- Goto K, Ohashi H, Ebukuro S, et al. 1998. Isolation and characterization of *Helicobacter* species from the stomach of the house musk shrew (*Suncus murinus*) with chronic gastritis. *Current Microbiology*, 37(1): 44–51.
- Goto K, Ohashi H, Takakura A, et al. 2000. Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rats, gerbils, and house musk shrews in Japan. *Current Microbiology*, 41(3): 161–166.
- Gu W, Tong P, Liu C, et al. 2019. The characteristics of gut microbiota and commensal Enterobacteriaceae isolates in tree shrew (*Tupaia belangeri*). *BMC Microbiology*, 19(1): 203.
- Haines D C, Gorelick P L, Battles J K, et al. 1998. Inflammatory large bowel disease in immunodeficient rats naturally and experimentally infected with *Helicobacter bilis*. *Veterinary Pathology*, 35(3): 202–208.
- Johansson S K, Feinstein R E, Johansson K E, et al. 2006. Occurrence of *Helicobacter* species other than *H. hepaticus* in laboratory mice and rats in Sweden. *Comparative Medicine*, 56(2): 110–113.
- Lu C, Sun X, Li N, et al. 2018. CircRNAs in the tree shrew (*Tupaia belangeri*) brain during postnatal development and aging. *Aging (Albany NY)*, 10(4): 833–852.
- Sheh A, Shen Z, Fox J G. 2014. Draft genome sequences of eight enterohepatic *Helicobacter* species isolated from both laboratory and wild rodents. *Genome Announcement*, 2(6): e01218–14.
- Taylor N S, Xu S, Nambiar P, et al. 2007. Enterohepatic *Helicobacter* species are prevalent in mice from commercial and academic institutions in Asia, Europe, and North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(7): 2166–2172.
- Wu M, Rao D, Zhu Y, et al. 2017. Differentiation of five enterohepatic *Helicobacter* species by nested PCR with high-resolution melting curve analysis. *Helicobacter*, 22(2): 1–7.
- 杨学芳, 李波, 郑红, 等. 2019. 树鼩肠道菌群多样性与功能预测研究. *安徽农业科学*, 47(8): 101–103.
- 中国实验动物协会. 2017. 实验动物螺杆菌 PCR 检测方法. 北京: T/CALAS 24-2017.