

张洛瑞, 张馨月, 陈思齐, 等. 新西兰兔发情与结肠微生物关联性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (5): 1-9.

ZHANG M R, ZHANG X Y, CHEN S Q, et al. Study on the association between estrus in New Zealand rabbits and microbiota in the colon [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (5): 1-9.

新西兰兔发情与结肠微生物关联性研究

张洛瑞, 张馨月, 陈思齐, 顾明珂, 姜幸慧, 陈晶, 甘乾福*

(福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 旨在探究与新西兰白兔发情相关的雌二醇 (E_2) 激素和肠道微生物的关系。通过外阴发情鉴定选择间情期 (UN 组) 和发情期 (ES 组) 的母兔, 使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测血浆 E_2 激素水平, 宏基因组学方法测定结肠微生物组成和功能, 并分析与发情状态的关联性。结果: 通过宏基因组测序对样本进行物种注释和功能分析发现, 新西兰白兔 UN 组结肠微生物的丰度显著高于 ES 组 ($P < 0.05$), 其中 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 是 ES 组代表菌种, 假黄解菌属 (*Pseudoflavonifactor*) 和鼠乙酸杆菌 (*Acetatifactor muris*) 是 UN 组代表菌; 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 功能差异分析发现, 与氨基酸代谢、碳水化合物代谢等相关的微生物丰度在 UN 组较高, 而聚糖的生物合成和代谢、细胞生长与死亡和信号转导相对丰度在 ES 组中较高; 通过碳水化合物活性酶 (CAZy) 差异分析发现糖苷水解酶 UN 组显著富集 ($P < 0.05$), 多糖裂解酶、糖酯酶、氧化还原酶在 ES 组显著富集 ($P < 0.05$); 相关性分析显示结肠微生物组成和功能与发情状态和血浆 E_2 水平显著相关 ($P < 0.05$)。综上所述, 本试验结果初步表明结肠微生物组成在母兔不同发情状态时存在显著差异, 为新西兰白兔发情机制研究提供方向。

关键词: 新西兰白兔; 发情期; 间情期; 结肠微生物

中图分类号: S829.1 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)05-0001-09

Study on the association between estrus in New Zealand rabbits and microbiota in the colon

ZHANG Mingrui, ZHANG Xinyue, CHEN Siqi, GU Mingke, JIANG Xinghui, CHEN Jing, GAN Qianfu*

(College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the relationship between estrogen related to estrus and gut microbiota in New Zealand white rabbits. Female rabbits in diestrus (UN) and estrus (ES) were selected by visual estrus detection based on vulval changes, plasma estradiol was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and metagenomic detection methods were used to determine the composition and function of colonic microorganisms and estrus status, and the correlation between them was analyzed. The result were as follows: After conducting species annotation and functional analysis on the samples through metagenomic sequencing, it was found that the abundance of the colonic microbiota in New Zealand white rabbits UN was significantly higher than that in ES ($P < 0.05$). Among them, Alphaproteobacteria was the representative species of the ES group, *Pseudoflavonifactor* and *Acetatifactor muris* were the representative species of the UN group. The KEGG functional difference analysis showed that the abundance of microorganisms related to amino acid metabolism and carbohydrate metabolism was higher in the UN group, while the relative abundance of glycan biosynthesis and metabolism, cell growth and death, and signal transduction was higher in the ES group. The difference analysis of CAZy showed that glycoside hydrolases were significantly enriched in the UN group ($P < 0.05$), while polysaccharide lyase, glycoesterase, and oxidoreductases were significantly enriched in the ES group ($P < 0.05$). The correlation analysis showed that colonic microbial composition and function were significantly correlated with estrous status and plasma E_2 levels ($P < 0.05$). In summary, this study preliminarily demonstrated that there were significant differences in colonic microbial composition in different estrus states, which might serve as a direction for further research on the mechanism of estrus in New Zealand white rabbits.

Keywords: New Zealand white rabbit; estrus; diestrus; colonic microorganism

收稿日期: 2025-06-06; 修回日期: 2026-02-14

基金项目: 福建省中青年教育科研项目 (JAT220070); 福建省科技计划项目 [高校产学研合作项目 (2023N5004), 福建省星火项目 (2023S0007, 2023S0015, 2023S0054), 福建省对外合作项目 (2023H1009)]; 福建农林大学乡村振兴服务团队-草食性动物产业服务团队项目 (11899170139)

第一作者: 张洛瑞, 女, 硕士

* 通信作者: 甘乾福, 教授, 研究方向为动物遗传育种与繁殖, E-mail: ganning707@163.com。

发情作为动物繁殖周期的初始阶段之一,对母兔妊娠率具有直接影响^[1]。研究母兔发情机制可优化兔场养殖模式,提高母兔繁殖力与利用率^[2]。发情是机体的正常生理过程,需要机体多系统调节配合。肠道菌群数量庞大,结构复杂,被越来越多的研究人员认为是影响机体发情的潜在因素^[3]。因此对新西兰白兔肠道微生物与发情关联的研究具有重要意义。

研究表明,雌性不同生殖生理阶段肠道微生物的组成会发生改变。大白猪×荷兰长白猪后代母猪粪便中梭菌属、脱硫弧菌属和普氏菌属的丰度随着妊娠的进程而增加,在断奶时则减少^[4];高繁殖力的梅山母猪肠道微生物多样性高于低繁殖力梅山母猪^[5];断奶后正常发情的母猪肠道富含乳酸菌和拟杆菌,而断奶后不发情的母猪链球菌属、梭菌属等相对丰度更高^[6]。发情期湖羊直肠内容物中厚壁菌门相对丰度显著低于发情前,而拟杆菌门占比则在发情期时显著升高^[7]。Wu等^[8]研究西门塔尔奶牛同期发情处理过程中肠道菌群的变化,认为雌二醇(E₂)可能介导肠道微生物α多样性指数、β多样性指数和生物标志物等的变化。李智鹏^[9]研究发现,自然发情与人工诱导发情方式对滇南小耳猪肠道微生物具有显著影响。以上研究结果揭示发情周期的变化可能影响肠道菌群的组成。

同时,肠道微生物也可反作用于动物体,影响其发情状态。唐义梅^[10]将初情期更早的梅山猪粪移植给大白×大白后代母猪,导致受体的初情期提前,且发情周期中雌激素浓度升高。接受健康大鼠的乳酸菌和粪便细菌移植能够使绝大多数多囊卵巢综合征大鼠的卵巢形态逐渐正常化^[11]。研究表明,肠道菌群可能通过编码多种类固醇酶来调节局部和全身的性类固醇激素水平^[12]。Kwa等^[13]研究发现肠道细菌衍生的β-葡萄糖醛酸酶(β-glucuronidase, GUS),β-葡萄糖苷酶和羟基类固醇脱氢酶(hydroxysteroid dehydrogenase, HSD),可将共轭雌激素转化为游离态,从而促进雌激素被重新吸收到肠肝循环中。这些研究表明,肠道微生物影响了宿主的生殖生理。

为了探究家兔发情与肠道微生物之间的关联,本研究采集发情期和间情期的新西兰白兔结肠内容物进行宏基因组测序,并检测血浆E₂水平及外阴发情鉴定相关数据,对肠道微生物及相关数据进行联合分析,为后续研究家兔发情调控提供新的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验样本采集

选择福建省春龙农牧科技有限公司提供的健康、体重(1.75±0.25)kg的成年(130~135日龄)未

经产新西兰白兔作为研究对象。在光照16h,(24±2)℃条件下,每日08:00与16:00观察新西兰白兔外阴色泽、肿胀度及接受爬跨反应,连续记录2个完整发情周期(周期长度8~15d)。依据末次周期表现,于间情期(1~6d)选取外阴苍白、无肿胀母兔4只,设为UN组;于发情期(7~11d)选取外阴大、红、轻度水肿母兔5只,设为ES组。使用负压抗凝采血管进行耳缘静脉采血,4℃、3000r/min离心,获得血浆,-20℃保存,用于后续血浆E₂水平检测。使用过量异氟烷麻醉至家兔呼吸、心跳完全停滞,角膜反射消失。立即沿腹白线切开,避免刺破肠道,取中段结肠,使用一次性无菌勺采集兔结肠内容物转移至2mL无菌冻存管,液氮速冻后-80℃保存,用于后续宏基因组测序。

1.2 E₂激素水平检测

严格按照QuicKey Pro-兔E₂(ELISA)试剂盒(JL26356,检测范围:15.63~1000pg/mL,灵敏度:5.65pg/mL,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)说明操作检测UN组和ES组E₂水平。

1.3 宏基因组学

使用天根生化科技(北京)有限公司DP705试剂盒提取结肠内容物样本DNA,并进行浓度和完整性检测,合格的微生物DNA样本用于后续测序。使用VAHTS® Universal Plus DNA Library Prep Kit for Illumina ND617试剂盒将合格样本DNA打断并建立测序文库,文库质检合格后用Illumina测序仪进行测序。使用Fastp^[14]软件,进行接头和低质量序列的过滤,然后利用Bowtie2^[15]软件同宿主基因组序列(Oryctolagus_cuniculus. UM NZW 1.0)进行比对,去除宿主污染,得到有效序列(clean reads)。使用软件MEGAHIT^[16]进行宏基因组组装、过滤。采用质量评估工具QUAST^[17]去除冗余基因集。比对到非冗余蛋白数据库(NR)的物种信息,得到样品的物种组成和相对丰度信息。使用线性判别分析效应大小(LEfSe)获得不同组间具有统计学差异的标志微生物。分别使用京都基因与基因组百科全书(KEGG)和碳水化合物活性酶(CAZy)^[18]数据库对基因功能进行注释和功能富集分析,利用宏基因组图谱统计分析STAMP软件^[19]进行差异分析与结果展示。

1.4 数据统计与分析

使用Origin 2022绘制ELISA标准曲线,并计算血浆E₂浓度,使用GraphPad Prism 9通过Welch's *t*-test对数据进行差异性检验并绘图,数据表示为“平均数±标准误”。使用LEfSe分析^[20]筛选组间差异菌群。通过STAMP软件,使用Welch's *t*-test方法,设置95%置信区间,以P<0.05为标准进行菌群功能差

异分析。相关性分析使用 Spearman^[21] 相关检验, 筛选相关系数 $|r| > 0.5$, $P < 0.05$ 的数据组。

2 结果与分析

2.1 母兔发情状态鉴定

如图 1A 所示, UN 组母兔外阴呈现白色, ES 组母兔外阴呈现红肿、湿润状态。为了进一步确认母兔的发情状态, 通过 ELISA 测定母兔血浆 E_2 浓度。如图 1B 所示, ES 组血浆 E_2 水平显著高于 UN 组母兔 ($P < 0.01$), 结合外阴部黏膜状态, 表明 ES 组母兔处于发情盛期。

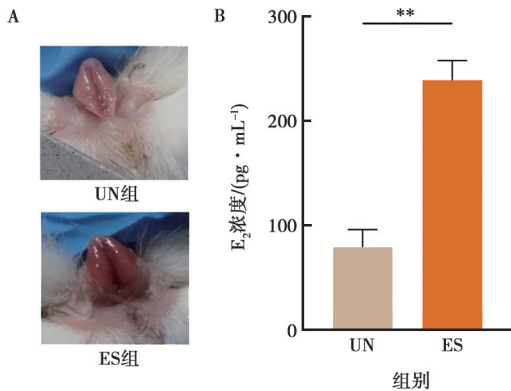


图 1 A. 不同发情阶段外阴部黏膜特征; B. 血浆 E_2 浓度。* * 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 1 母兔发情状态鉴定

2.2 结肠微生物群落 α 多样性分析

如表 1 所示, 在种分类水平上使用 Shannon 指数分析样本物种多样性, Simpson 指数分析样本物种优势度, 使用 Chao1 指数和 Ace 指数来衡量样本物种丰富度。结果可见, UN 组 Shannon 指数显著高于 ES 组 ($P < 0.05$), Simpson、Chao1 和 Ace 指数组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 1 微生物 α 多样性分析

指数	UN 组	ES 组
Shannon	6.49±0.04*	6.38±0.08
Simpson	0.990 0±0.000 7	0.990 0±0.000 7
Ace	11 144.45±262.12	10 984.61±584.21
Chao1	11 129.38±261.96	10 969.80±583.31

注: * 表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 结肠微生物分类组成分析

结肠微生物的门、属和种水平丰度分析对非冗余基因进行物种注释后共获得 20 520 个物种注释, 分别属于 6 界, 198 门, 768 科, 3 323 属。通过对不同分类水平上新西兰白兔结肠内容物微生物组成及占比分析发现, 界水平上, 新西兰白兔结肠内容物中微生物可分为细菌、真核生物、原生生物、真菌、古生菌和病毒。门水平上, 微生物丰度排名前 10 的为厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、软壁菌门 (Tenericutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、放线菌门 (Actinobacteria)、候选糖细菌门 (Candidatus_Saccharibacteria)、广古菌门 (Euryarchaeota)、候选黑细菌门 (Candidatus_Melainibacteria) 和尾噬菌体门 (Uroviricota) (图 2)。属水平上, 微生物丰度排名前 10 的为梭菌属 (*Clostridium*)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、支原体属 (*Mycoplasma*)、真细菌属 (*Eubacterium*)、阿克曼菌 (*Akkermansia*)、普雷沃氏菌属 (*Prevotella*)、另枝菌属 (*Alistipes*)、颤螺菌属 (*Oscillibacter*) 和假黄解菌属 (*Pseudoflavonifractor*) (图 3)。

2.4 微生物 LEfSe 检验分析

为了揭示结肠微生物的组成差异, 利用 LEfSe 检验 ($P < 0.05$, $LDA > 3.5$) 在微生物各分类水平上对 UN 和 ES 组丰富度进行差异分析, 通过 LDA 值分布柱状图显示其丰富度差异, 通过物种进化树显示微生物的分类关系。如图 4 所示, 二者在门水平上没有差异; 在纲水平上, α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 在 ES 组显著富集; 属水平上, 乙酸杆菌属 (*Acetatifactor*) 和假黄解菌属在 UN 组显著富集; 种水平上, 鼠乙酸杆菌 (*Acetatifactor muris*) 在 UN 组显著富集。

2.5 结肠微生物功能注释及差异分析

分析不同时期微生物群落的丰度差异, 并进行 KEGG 富集分析, 共发现 41 个差异通路, 此处选择排名前 7 的 KEGG 差异通路进行展示。如图 5 所示, ES 组中乙苯降解 (ethylbenzene degradation)、糠醛降解 (furfural degradation)、氰基氨基酸代谢 (cyanamino acid metabolism) 等通路显著富集 ($P < 0.01$); UN 组中苯丙烷生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis) 和万古霉素类抗生素生物合成 (biosynthesis of vancomycin group antibiotics) 显著增加 ($P < 0.01$)。

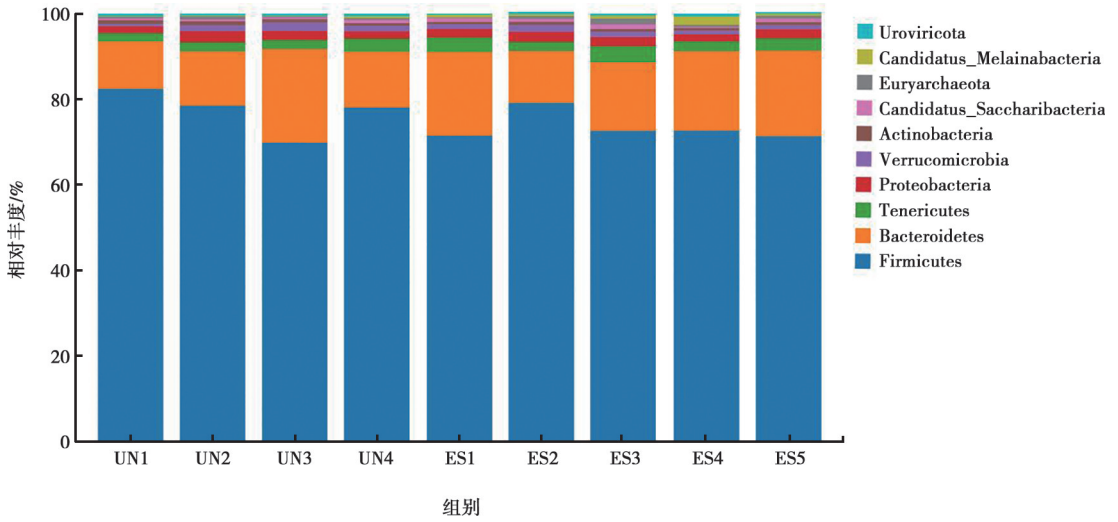


图 2 门水平微生物相对丰度分析

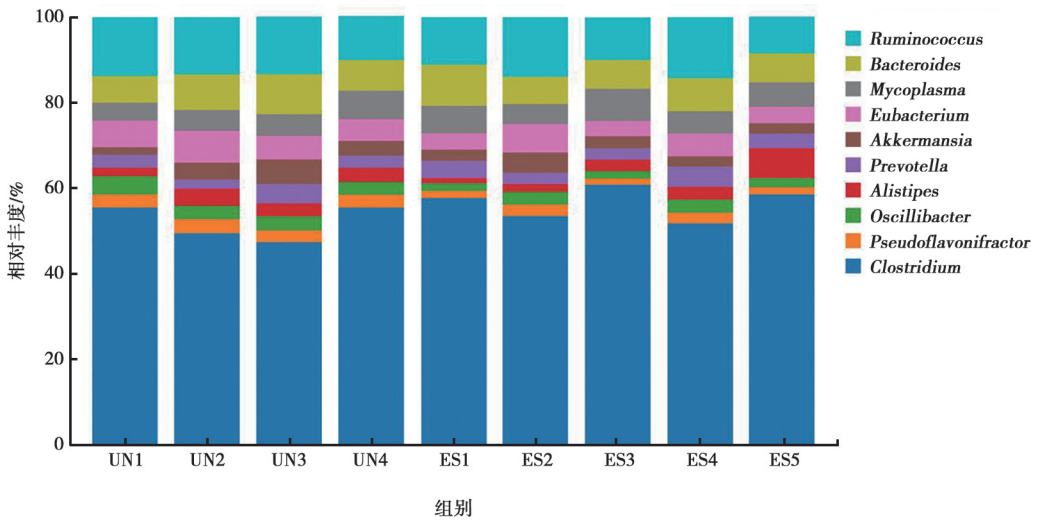
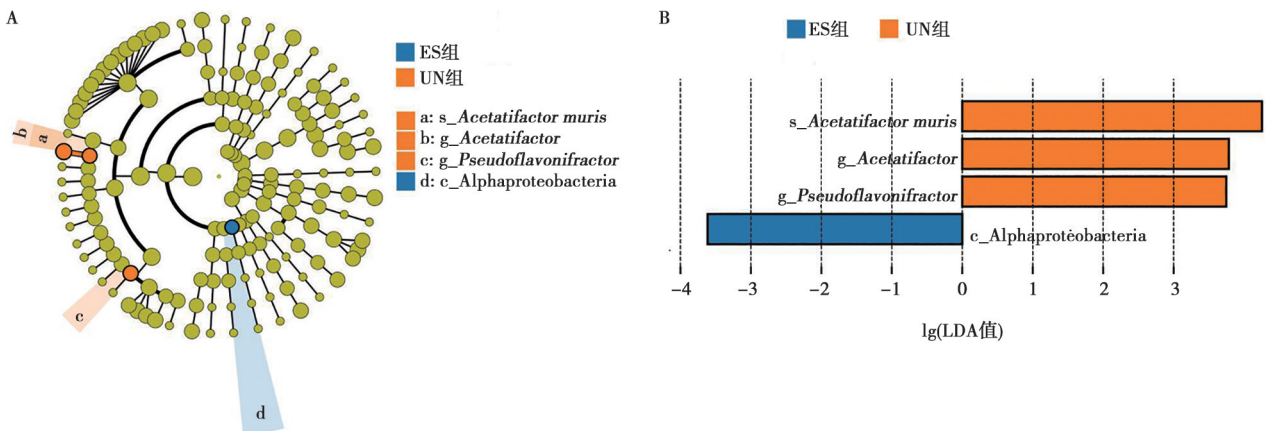


图 3 属水平微生物相对丰度分析



A. LEISe 检验进化分支图; B. LDA 值分布柱状图。

图 4 结肠微生物的组成差异分析

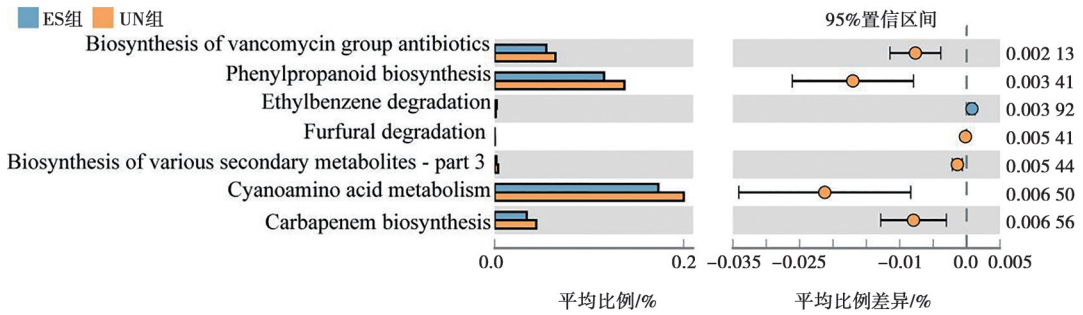


图5 不同发情期微生物 KEGG 差异通路 (排名前7)

2.6 微生物群 CAZy 差异分析

使用 STAMP 软件分析不同发情阶段 CAZy 的丰度差异, 得到 22 个差异显著的 CAZy。如图 6 所示, 其中糖苷水解酶 (glycoside hydrolases, GHs) 类有 9 个, 分别是 GH25、GH33、GH73、GH79、GH112、GH125、GH127、GH139 和 GH143, 在 UN 组中的丰度均显著高于 ES 组 ($P < 0.05$)。多糖裂解酶 (polysaccharide lyases, PLs) 类中差异显著的有 5 个, 包括 PL2、PL4、PL15、PL33 和 PL9, 其中 PL4 在 ES 组中的丰度显著高于 UN 组 ($P < 0.05$), 其余 4 个则

在 UN 组中丰度更高 ($P < 0.05$)。碳水化合物结合结构域 (carbohydrate-binding modules, CBMs) 类中差异显著的有 6 个, 分别是 CBM1、CBM2、CBM6、CBM13、CBM62 和 CBM89, 除 CBM2 外其余 5 个 CBMs 均在 ES 组中显著升高 ($P < 0.05$)。糖酯酶 (carbohydrate esterases, CEs) 类, 氧化还原酶 (auxiliary activities, AAs) 类和糖基转移酶 (glycosyltransferases, GTs) 类中的 CE15、AA9 和 GT4 在 ES 组中的丰度显著高于 UN 组 ($P < 0.05$)。

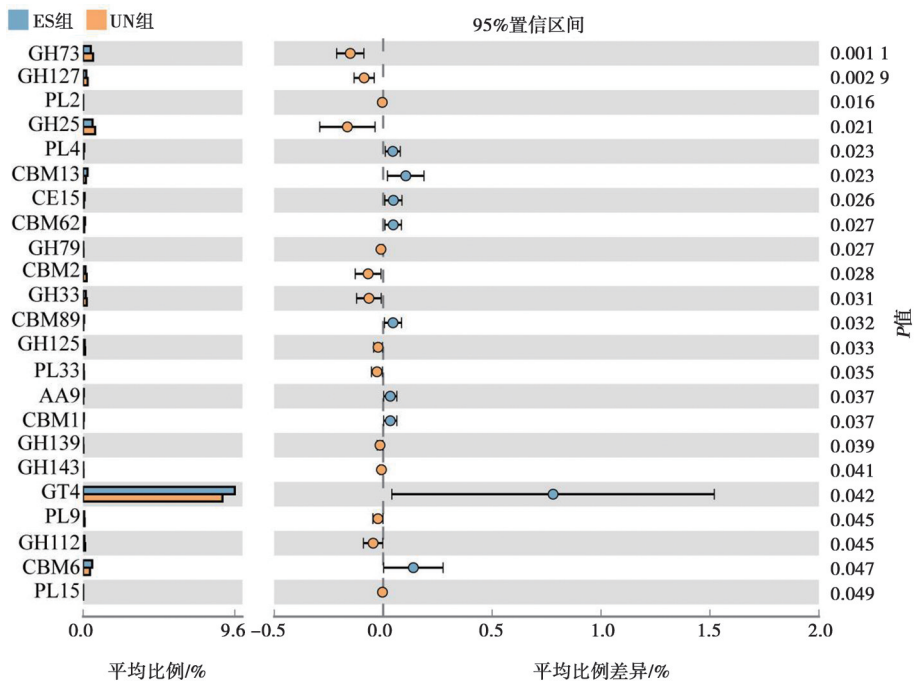


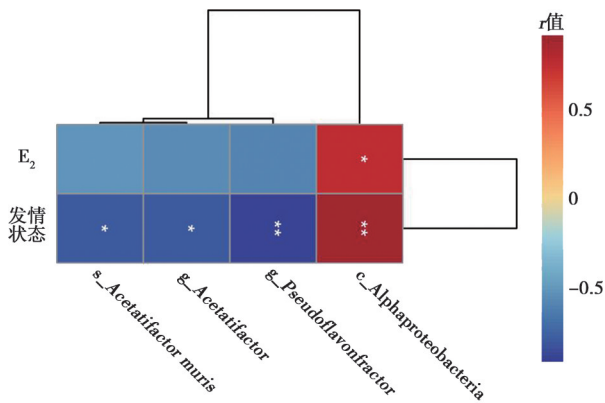
图6 微生物群 CAZy 差异分析

2.7 发情与结肠微生物的相关性分析

2.7.1 血浆 E₂ 水平和发情状态与微生物相关性分析

为了进一步了解肠道微生物与发情之间的关系, 利用两组的肠道差异微生物数据及血浆 E₂ 水平和发情状态基于 Spearman 相关检验进行关联分析, 评估肠道微生物变化对宿主发情的贡献。结果如图 7 所

示, 在 ES 组显著富集的 α -变形菌纲 ($r = 0.75$) 与 E₂ ($r = 0.87$) 和发情状态呈现显著正相关 ($P < 0.05$), 富集在 UN 组的乙酸杆菌属 ($r = -0.77$)、假黄解菌属 ($r = -0.87$) 和鼠乙酸杆菌 ($r = -0.77$) 与发情状态表现为显著负相关 ($P < 0.05$), 但与 E₂ 无显著相关性。



*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。下同。

图7 血浆 E_2 水平和发情状态与微生物的相关性聚类热图分析

2.7.2 血浆 E_2 水平和发情状态与 KEGG 通路相关性分析

为了评估肠道微生物功能与发情之间的关系，使用 STAMP 分析筛选得到的 KEGG 差异通路与 E_2 和发情状态基于 Spearman 相关检验，分析肠道微生物功能对宿主发情的贡献。结果如图 8 所示，血浆 E_2 与乙苯降解 (ethylbenzene degradation, ko00642) ($r = 0.8$)，细胞周期 (cell cycle, ko04110) ($r = 0.76$)，磷脂酶 D 信号通路 (phospholipase D signaling pathway, ko04072) ($r = 0.7$) 呈现显著正相关 ($P < 0.05$)；与细胞周期-酵母 (cell cycle-yeast, ko04111) ($r = 0.86$) 和细胞衰老 (cellular senescence, ko04218) ($r = 0.86$) 呈极显著正相关 ($P < 0.01$)；与糠醛降解 (furfural degradation, ko00365) ($r = -0.71$)，氰胺酸代谢 (cyanoamino acid metabolism, ko00460) ($r = -0.71$) 和次生代谢 (secondary metabolism, 99988)

($r = -0.73$) 呈现显著负相关 ($P < 0.05$)；与各种次生代谢物的生物合成-3 (biosynthesis of various secondary metabolites - part 3, ko00997) ($r = -0.85$, $P < 0.01$) 呈极显著负相关。与发情状态显著相关的 KEGG 通路数量大于血浆 E_2 ，且相关通路具有重合，其中 ko04072 ($r = 0.77$)，ko04218 ($r = 0.77$)，糖胺聚糖生物合成-硫酸肝素/肝素 (glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate/heparin, ko00534) ($r = 0.77$)，轴突再生 (axon regeneration, ko04361) ($r = 0.69$)，ko05135 ($r = 0.69$) 和抗利尿激素调节水的再吸收 (vasopressin - regulated water reabsorption, ko04962) ($r = 0.69$) 与发情状态呈显著正相关 ($P < 0.05$)；ko00642 ($r = 0.86$)，ko04110 ($r = 0.86$)，ko04111 ($r = 0.86$)，磷脂酰肌醇信号系统 (phosphatidylo-sitol signaling system, ko04070) ($r = 0.86$)，ko05133 ($r = 0.86$) 和 ko05160 ($r = 0.86$) 与发情状态呈极显著正相关 ($P < 0.01$)；ko00460 ($r = -0.77$)，碳青霉烯生物合成 (carbapenem biosynthesis, ko00332) ($r = -0.77$)，苯甲酸降解 (Benzoate degradation, ko00362) ($r = -0.77$)，氨基酸代谢 (amino acid metabolism, 99985) ($r = -0.69$)，黄酮和黄酮醇的生物合成 (flavone and flavonol biosynthesis, ko00944) ($r = -0.69$) 和 ABC 转运蛋白 (ABC transporters, ko02010) ($r = -0.69$) 与发情状态呈现显著负相关 ($P < 0.05$)；ko00997 ($r = -0.86$)，万古霉素类抗生素的生物合成 (biosynthesis of vancomycin group antibiotics, ko01055) ($r = -0.86$)，苯丙烷生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis, ko00940) ($r = -0.86$)，99988 ($r = -0.86$) 和 ko00365 ($r = -0.86$) 与发情状态呈极显著负相关 ($P < 0.01$)。

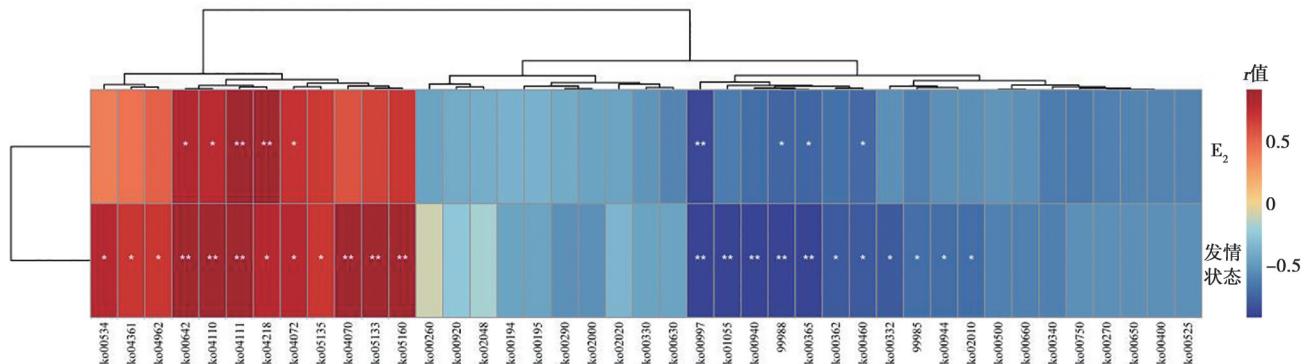


图8 血浆 E_2 水平和发情状态与 KEGG 通路的相关性聚类热图分析

2.7.3 血浆 E_2 水平和发情状态与 CAZy 相关性分析

为了评估肠道微生物 CAZy 与发情之间的关系，使用 STAMP 分析筛选得到的差异 CAZy 与 E_2 和发情

状态基于 Spearman 相关检验，进行关联分析，分析肠道微生物 CAZy 对宿主发情的贡献。结果如图 9 所示， E_2 与 AA9 ($r = 0.8$) 和 CBM1 ($r = 0.8$) 呈现显

显著正相关 ($P < 0.05$)；与 CBM89 ($r = 0.83$) 呈极显著正相关 ($P < 0.01$)；与 GH143 ($r = -0.78$)、GH73 ($r = -0.76$)、GH33 ($r = -0.75$) 和 GH139 ($r = -0.75$) 呈现显著负相关 ($P < 0.05$)；与 GH127 ($r = -0.83$) 和 PL2 ($r = -0.86$) 呈极显著负相关 ($P < 0.01$)。发情状态与 AA9 ($r = 0.77$)、CBM1 ($r = 0.77$)、CBM13 ($r = 0.69$)、CBM62 ($r = 0.69$) 和 CE15 ($r = 0.69$) 呈现显著正相关 ($P < 0.05$)；与 PL4 ($r = 0.86$) 和 CBM89 ($r = 0.86$) 呈极显著正相

关 ($P < 0.01$)；与 GH73 ($r = -0.77$)、PL33 ($r = -0.77$)、PL15 ($r = -0.77$) 和 GH139 ($r = -0.69$) 呈现显著负相关 ($P < 0.05$)；与 GH127 ($r = -0.86$)、PL2 ($r = -0.86$)、GH33 ($r = -0.86$)、GH112 ($r = -0.86$) 呈极显著负相关 ($P < 0.01$)。与 E_2 和发情状态相关的 CAZy 有区别，如 PL4、CBM62、CBM13 和 CE15 与发情状态表现显著正相关，与 E_2 无显著相关；而 GH143 则与 E_2 呈显著负相关，与发情状态无显著相关。

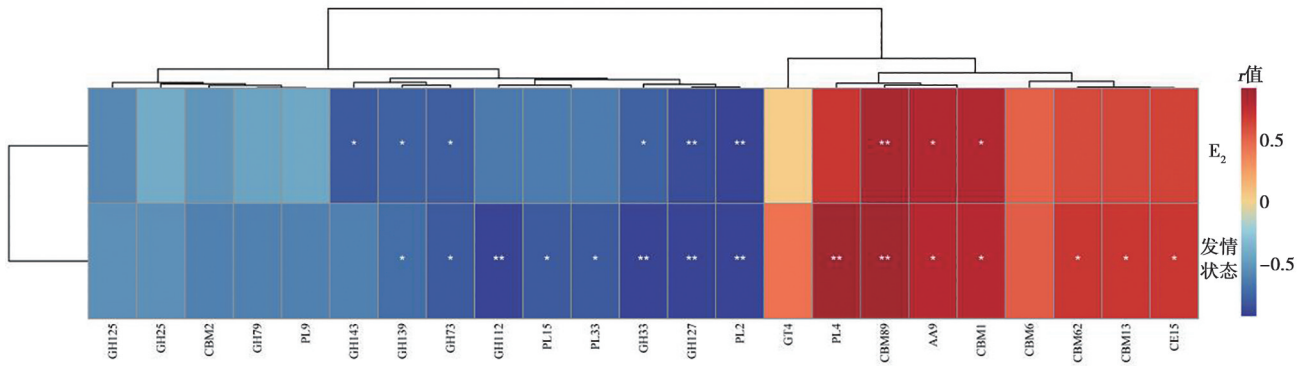


图9 血浆 E_2 水平和发情状态与 CAZy 的相关性聚类热图分析

3 讨论

胃肠道内容物携带大量微生物，可反映肠道微生物状态和机体生理代谢现状^[22]。传统微生物的研究方法无法全面分析复杂庞大且未知的肠道微生物群。宏基因组测序通过高通量测序技术对微生物群落中的 DNA 进行测序，计算基因丰度并注释物种和功能，揭示微生物群落的多样性和作用^[23-24]。本研究中，UN 组微生物多样性显著高于 ES 组，两组微生物的主要组成均为厚壁菌门、拟杆菌门、软壁菌门和变形菌门。LEfSe 分析进一步发现， α -变形菌纲在 ES 组显著富集，而假黄解菌属和鼠乙酸杆菌在 UN 组显著富集。

α -变形菌纲是变形菌门的一个分类，变异性极大，可耐受低营养食物，也可引起生物疾病^[25]。靳荣帅^[26]研究发现，母兔发情期开始后，采食时间逐渐降低，在发情盛期时达到最低。因此，推测本试验 ES 组 α -变形菌纲的富集可能是因为发情期开始后母兔采食量降低而导致的。

UN 组富集的假黄解菌属和鼠乙酸杆菌均被认为会影响肥胖及其他并发症的发展进程。假黄解菌属是厚壁菌门、瘤胃球菌科的一个属，现有研究表明其与能量代谢和胰岛素敏感性有关。李辞霞^[27]发现生酮饮食会增加小鼠体内假黄解菌属丰度，生酮饮食采用极低碳水化合物摄入模式模拟饥饿环境，使机体主要

依靠脂肪代谢产生酮体供能，说明假黄解菌属的主要代谢物可能是脂肪。鼠乙酸杆菌则是一种在肥胖小鼠肠道中发现的细菌^[28]。对肥胖小鼠使用降胆固醇药物，可显著降低血糖和体脂，推测可能是由于小鼠肠道内鼠乙酸杆菌和肠鼠杆菌属 (*Muribaculum*) 的增加导致的^[29]。富集分析结果显示，UN 组中糖苷水解酶分类的丰度显著升高，在 UN 组中显著富集的 KEGG 通路也多为氨基酸代谢、碳水化合物代谢和其他次生代谢物的生物合成等，与微生物变化相对应。综上，可推测 UN 组假黄解菌属和鼠乙酸杆菌的高丰度会使母兔脂肪和糖代谢水平增加。

通过血浆 E_2 水平和发情状态与 KEGG 通路进行相关性分析，在 KEGG 通路中，磷脂酶 D (PLD) 信号通路在 ES 组显著上调。PLD 信号通路是细胞内的一种次级信号传递系统，参与调控多种生物学过程。肠道微生物可通过激活 PLD 信号通路调控宿主的代谢和免疫反应。Chen 等^[30]发现，食物摄入诱导的肠道 N-酰基磷脂酰乙醇胺 (NAPE) 需要通过 PLD 的作用转化为 N-酰基乙醇酰胺才能发挥降低体重的作用。因此，PLD 信号通路在 ES 组中上调可能引起母兔食欲降低，以及防止肥胖及多囊卵巢综合征的发病率，从而促进母兔发情。

微生物相关性分析结果显示， α -变形菌纲与 E_2 和发情状态均呈现显著正相关。Kisiela 等^[31]研究发现，HSD 属于短链脱氢酶或醛酮还原酶超家族，是

参与类固醇激素代谢的重要酶,而放线菌门、变形菌门和厚壁菌门等构成正常人类胃肠道环境的菌群大量表达 HSD, α -变形菌纲在 ES 组的上调可能是因为 E_2 上升诱导的,与本研究结果趋势相同。ES 组上调的 KEGG 通路均与发情状态显著正相关,说明影响发情期肠道微生物变化的因素包括但不限于 E_2 水平,可能还包括其他因素。

微生物 GUS 是由 uidA 基因编码的一个结构和功能广泛的酶群,属于糖苷水解酶家族 2 (GH2)。GUS 是微生物调节机体 E_2 水平的重要物质,且在 E_2 介导的疾病中起重要调节作用,是宿主-肠道微生物群相互作用的重要媒介^[32]。研究表明 GUS 参与雌激素代谢,而粪便中 GUS 活性与粪中总 E_2 相关^[32-35]。本试验未发现 GUS 酶在两组间的差异,可能是因为雌激素对肠道微生物群中 GUS 的抑制作用^[36]。ES 组与 UN 组血浆 E_2 水平的差异与其他 CAZy 糖苷水解酶家族呈显著负相关,可能为雌激素代谢调控的研究提供了新的酶群信息。同时血浆 E_2 水平明确了两组试验兔的生理状态,这可能是因为完全发情母兔的血浆 E_2 主要是由卵巢卵泡发育产生的。

4 结论

本研究对不同发情状态的母兔进行了结肠微生物宏基因组学及血浆 E_2 水平分析。研究结果揭示,在不同发情状态时,新西兰白兔肠道微生物组成、功能及其代谢物发生了改变。ES 组结肠微生物丰富度显著降低, α -变形菌纲是发情母兔的肠道代表性微生物,UN 组母兔的肠道代表性微生物为假黄解菌属和鼠乙酸杆菌。ES 组母兔肠道微生物的功能基因主要与糖的生物合成和代谢、细胞生长与死亡和信号转导等通路有关,UN 组母兔肠道微生物的功能基因主要与氨基酸代谢、碳水化合物代谢和其他次生代谢物的生物合成等通路相关。研究结果为进一步揭示肠道微生物和宿主生殖生理的互作机制提供了新的依据。

参考文献:

- BRIDGES A, MUSSARD M L, BURKE C R, et al. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle [J]. Anim Reprod Sci, 2010, 117 (3/4): 208-215.
- 周娟. 新西兰白兔频繁繁殖效果及耐频繁繁殖基因的筛选 [D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
- LIU M, ZHANG J, ZHOU Y, et al. Gut microbiota affects the estrus return of sows by regulating the metabolism of sex steroid hormones [J]. J Anim Sci Biotechnol, 2023, 14 (1): 155.
- SHIN J H, PARK Y H, SIM M, et al. Serum level of sex steroid hormone is associated with diversity and profiles of human gut microbiome [J]. Res Microbiol, 2019, 170 (4/5): 192-201.
- SHAO Y, ZHOU J, XIONG X, et al. Differences in gut microbial and serum biochemical indices between sows with different productive capacities during perinatal period [J]. Front Microbiol, 2020, 10: 3047.
- 张佳. 肠道及生殖道微生物组成对母猪断奶后不发情的影响及其机理初探 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2021.
- 王智博, 姚晓磊, 张红琳, 等. 不同产羔数和发情时期湖羊代谢产物及肠道菌群结构的差异分析研究 [J]. 南京农业大学学报, 2021, 44 (3): 548-553.
- WU D, WANG C, SIMUJIDE H, et al. Reproductive hormones mediate intestinal microbiota shifts during estrus synchronization in grazing Simmental cows [J]. Animals, 2022, 12 (14): 1751.
- 李智鹏. 不同发情方式对滇南小耳猪粪便微生物组成及多样性的影响 [D]. 昆明: 云南农业大学, 2023.
- 唐义梅. 梅山猪粪便微生物移植对长×大后备母猪卵泡发育的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- HE Y, WANG Q, LI X, et al. Lactic acid bacteria alleviate polycystic ovarian syndrome by regulating sex hormone related gut microbiota [J]. Food Funct, 2020, 11 (6): 5192-5204.
- PACE F, WATNICK P I. The interplay of sex steroids, the immune response, and the intestinal microbiota [J]. Trends Microbiol, 2021, 29 (9): 849-859.
- KWA M, PLOTTEL C S, BLASER M J, et al. The intestinal microbiome and estrogen receptor-positive female breast cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2016, 108 (8): djw029.
- CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. Bioinformatics, 2018, 34 (17): i884-i890.
- LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2 [J]. Nat Methods, 2012, 9 (4): 357-359.
- LI D, LIU C M, LUO R, et al. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph [J]. Bioinformatics, 2015, 31 (10): 1674-1676.
- GUREVICH A, SVELTIEV V, VYAHHI N, et al. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2013, 29 (8): 1072-1075.
- CANTAREL L, COUTINHO P M, RANCUREL C, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37: D233-D238.
- PARKSD H, TYSON G W, HUGENHOLTZ P, et al. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles [J]. Bioinformatics, 2014, 30 (21): 3123-3124.
- SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. Genome Biol, 2011, 12 (6): R60.
- BESTD J, ROBERTS D E. The upper tail probabilities of Spearman's RHO [J]. J R Stat Soc Ser C, 1975, 24 (3): 377-379.
- SONALI S, RAY B, AHMED TOUSIF H, et al. Mechanistic insights into the link between gut dysbiosis and major depression: an extensive review [J]. Cells, 2022, 11 (8): 1362.
- LOMANN J, PALLEN M J. Twenty years of bacterial genome sequencing [J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13 (12): 787-794.

- [24] 许思妍, 叶成智, 宦海琳, 等. 日粮中添加生物发酵饲料对肉鸡肠道形态、挥发性脂肪酸及微生物菌群的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2025, 48 (6): 1370-1379.
- [25] YOU Z, DENG J, LIU J, et al. Seasonal variations in the composition and diversity of gut microbiota in white-lipped deer (*Cervus albirostris*) [J]. PeerJ, 2022, 10: e13753.
- [26] 靳荣帅. 繁殖母兔不同发情阶段行为、生理的差异分析及机制初探 [D]. 扬州: 扬州大学, 2022.
- [27] 李辞霞. 生酮饮食对低血糖诱导小鼠脑损伤的保护作用及机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- [28] PFEIFFER N, DESMARCHELIER C, BLAUT M, et al. *Acetatifactor muris* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from the intestine of an obese mouse [J]. Arch Microbiol, 2012, 194 (11): 901-907.
- [29] NEWMANN K, MONNIER P M, RODRIGUES R R, et al. Host response to cholestyramine can be mediated by the gut microbiota [J]. Microbiome Res Rep, 2024, 3 (4): 40.
- [30] CHEN Z, ZHANG Y, GUO L, et al. Leptogenic effects of NAPE require activity of NAPE-hydrolyzing phospholipase D [J]. J Lipid Res, 2017, 58 (8): 1624-1635.
- [31] KISIELA M, SKARKA A, EBERT B, et al. Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria-A bioinformatic perspective [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012, 129 (1/2): 31-46.
- [32] SUI Y, WU J, CHEN J. The role of gut microbial β -glucuronidase in estrogen reactivation and breast cancer [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 631552.
- [33] FISHMANW H. B-glucuronidase activity of the blood and tissues of obstetrical and surgical patients [J]. Science, 1947, 105 (2738): 646-647.
- [34] SANDBERGA A, SLAUNWHITE W R Jr. Studies on phenolic steroids in human subjects. II. The metabolic fate and hepato-biliary-enteric circulation of C14-estrone and C14-estradiol in women [J]. J Clin Invest, 1957, 36 (8): 1266-1278.
- [35] FLORES R, SHI J, FUHRMAN B, et al. Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study [J]. J Transl Med, 2012, 10: 253.
- [36] CHENK L A, LIU X, ZHAO Y C, et al. Long-term administration of conjugated estrogen and bazedoxifene decreased murine fecal β -glucuronidase activity without impacting overall microbiome community [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 8166.