

C57BL/6J 伪无菌与 SPF 小鼠高脂饮食诱导的比较研究

卞恒娟¹, 曾本华², 王丽¹, 钟青萍¹, 李文霞², 魏泓², 方祥¹, 廖振林¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510640) (2. 第三军医大学基础部实验动物学教研室, 重庆 400038)

摘要: 肠道菌群与宿主肥胖密切相关, 伪无菌小鼠动物模型是研究肠道菌群与肥胖及其他相关疾病关系的有利“工具”。20 只 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠给予抗生素混合物饮水, 剔除大部分肠道微生物模拟无菌动物。随机分成两组: 对照组和高脂组, 分别饲喂常规纯化饲料与高脂纯化饲料 8 周; 同时以 20 只 SPF 级小鼠作对照。常规方法测定小鼠体重、血清中血糖、血脂指标和胰岛素水平, 并用软件测量脂肪细胞大小。结果表明, 与高脂组 SPF 小鼠相比, 高脂组伪无菌小鼠的体重、脂肪垫与肾周脂重量显著低于高脂组 SPF 小鼠; 胰岛素水平和脂肪细胞大小也显著低于 SPF 小鼠。高脂组伪无菌小鼠出现低体重低脂肪的表型, 与无菌小鼠动物模型极为相似。因此采用抗生素处理建立伪无菌小鼠动物模型可用来预示无菌小鼠试验的结果, 是研究肠道菌群与某些疾病的理想动物模型。

关键词: 肠道菌群; 肥胖; 抗生素; 伪无菌动物模型

文章编号: 1673-9078(2016)11-29-34

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.005

Comparative Study of High Fat Diet in Induced C57BL/6J Pseudo Germ-free Mice and Specific-pathogen-free (SPF) Mice

BIAN Heng-juan¹, ZENG Ben-hua², WANG Li¹, ZHONG Qing-ping¹, LI Wen-xia², WEI Hong², FANG Xiang¹, LIAO Zhen-lin¹

(1.College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

(2.Department of Laboratory Animal Science, College of Basic Medical Sciences, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Gut microbiotas are closely related with the obesity of their host. Pseudo germ-free mice are a useful animal model for studying the relationship of gut microbiota with obesity and other related diseases. Twenty C57BL/6J eight-week-old male mice were administered with antibiotic cocktails in drinking water to remove the gut microbiota to establish the pseudo germ-free mouse model. These mice were randomly divided into two groups: control (CONV) group and high fat (HF) group, which were fed with a normal diet and a high-fat diet for eight weeks, respectively. Meanwhile, 20 specific-pathogen-free (SPF) mice were used as controls. Body weight, serum glucose levels, serum lipid levels, and insulin concentrations of the mice were measured by normal methods, and the areas of fat cells were calculated using software. The results revealed that body weight, fat pad, and perirenal fat weight of the HF pseudo germ-free mouse group were significantly lower than those of the HF SPF mouse group ($p < 0.001$), and the insulin level and areas of fat cells in the HF pseudo germ-free mouse group were also significantly lower than those of SPF mice ($p < 0.01$). Pseudo germ-free mice in the HF diet group showed low bodyweight and a low-fat phenotype, which were extremely similar to those of germ-free mice. As a result, the pseudo germ-free mouse model, established using antibiotic cocktails, can be used to predict modulation results in germ-free mice and is an ideal animal model for exploring the relationship between gut microbiota and diseases.

Key words: gut microbiota; obesity; antibiotic cocktails; pseudo germ-free mouse model

肠道菌群作为人体的一种重要“代谢器官”, 可精

收稿日期: 2015-12-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31171673); 国家高技术研究发展计划 (2014AA022204, 2014AA022209)

作者简介: 卞恒娟 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物

通讯作者: 廖振林 (1968-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 益生元、益生菌与脂肪代谢; 方祥 (1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 益生元、益生菌与脂肪代谢

细的调节机体能量代谢。它不仅能够帮助消化胃肠道中不被完全消化的食物, 还可促进营养物质的重吸收提高能量利用率, 此外肠道菌群还具有免疫调节作用等^[1]。2012年, 上海交大教授赵立平发现一位肥胖患者肠道的阴沟肠杆菌含量占总菌量的30%, 患者减肥4周以后该菌含量就只有总菌量的0.5%^[2]。给无菌小鼠定制多形拟杆菌和甲烷杆菌后, 无菌小鼠体重明显增加且脂肪积累显著提高^[3]。分别向无菌小鼠体内移植

肥胖程度不同的双胞胎肠道菌群后,研究者发现定植肥胖者菌群的小鼠体重和脂肪累积量远大于定植瘦者菌群的小鼠,并且瘦型小鼠体内短链脂肪酸的含量及可转移胆酸的微生物增加了^[4]。持续摄取高脂饮食的成年小鼠的肠道菌群结构与正常饮食的小鼠有明显差异,并出现肥胖和胰岛素抵抗等相关症状。根据对肠道菌群的DNA检测结果发现摄取高脂饮食的肥胖小鼠肠道菌群中有益菌双歧杆菌较正常饮食小鼠相比大量减少。再给高脂饮食的小鼠饲喂正常饮食,4周后其肠道菌群结构与正常饮食小组的差异已不明显,10周后便与正常饮食小鼠的肠道菌群结构一致了^[5]。台湾长庚大学研究员Chih-Jung Chang发现给予高脂饮食诱导的肥胖小鼠灵芝提取物后这些肥胖小鼠体重下降、炎症改善与胰岛素敏感性增加等获益表型,除此之外还降低了代谢性内毒素血症的水平。该研究人员还通过粪便移植的方法将灵芝提取物干预后的小鼠粪便转移到高脂饮食诱导的肥胖小鼠体内,肥胖小鼠也表现出抗肥胖^[6]。

多项研究显示很多疾病与宿主肠道菌群关系密切,例如动脉硬化、二型糖尿病及结肠癌等,而这些都是威胁人体健康和生命安全的重要因素^[7-9]。

SPF级小鼠口服抗生素混合物后肠道微生物减少高达90%,并且小鼠的体重、外观状态、器官毒性和生理变化均与SPF级小鼠无显著性差异,小鼠盲肠较SPF级小鼠显著变大且盲肠内容物多呈液态此现象与无菌小鼠相同^[10-12]。因此通过口服抗生素混合物大量剔除小鼠肠道微生物的方法获得伪无菌小鼠模型,该模型可用于研究肠道菌群作为一个独立的“器官”对宿主能量代谢等功能的影响,可用于指示无菌小鼠模型的试验结果,甚至可以部分代替昂贵的无菌小鼠动物模型,是一个经济又简便的理想动物模型。但是无菌小鼠动物模型可以移植一种或多种菌种建立悉生动物模型,这是伪无菌动物无法做到的^[13]。本研究旨在建立伪无菌小鼠动物模型模拟无菌小鼠,是研究肠道菌群与宿主关系、肠道菌群与某些疾病关系等的高效经济的理想模型。

1 材料与amp;方法

1.1 原料

1.1.1 实验动物

40只8周龄健康的SPF级C57BL/6J雄性小鼠由第三军医大学实验动物中心提供。SPF级C57BL/6J小鼠许可证号:SYXK(渝)2012-0002。

1.1.2 主要试剂

饲料:AIN93标准常规纯化实验动物饲料(MD12031)、高脂造模纯化实验动物饲料(MD12032)购自江苏美迪森生物医药有限公司。抗生素:万古霉素、甲硝唑及新霉素购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。生理盐水和甲醛溶液购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠肥胖动物模型建立

20只SPF级C57BL/6J 8周龄雄性小鼠给予抗生素混合物饮水(万古霉素200 mg/kg、甲硝唑200 mg/kg、新霉素200 mg/kg)每三天喂一次^[14,15];并分成2组,每组10只,具体分组如下:普通饮食组(pgf CONV),饲喂常规纯化饲料和抗生素混合物饮水;高脂饮食组(pgf HF),饲喂高脂纯化饲料(高脂纯化饲料脂肪含量达45%,常规纯化饲料脂肪含量仅有10%)及抗生素混合物饮水;20只SPF级C57BL/6J 8周龄雄性小鼠随机分成2组,每组10只,spf CONV组与spf HF组,分别饲喂常规纯化饲料和高脂纯化饲料,正常饮水。

实验小鼠饲养于第三军医大学实验动物中心SPF级清洁区内,保持22~24℃恒温、舒适的湿度、12h光照以及12h黑暗。鼠笼、垫料和饮水瓶高温高压灭菌(121℃,110 kPa,45 min)。小鼠自由采食饮水,试验8周。

1.2.2 样品采集与amp;处理

试验期间观察小鼠健康状况、每周记录小鼠体重。试验8周后禁食12h,采用眼眶取血、收集血清,送往第三军医大学西南医院检测胰岛素、葡萄糖(GLU)、总胆固醇(Tch)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。采集小鼠肾周脂和附睾脂肪垫称重记录。

1.2.3 脂肪切片制备和脂肪细胞面积计算

附睾脂肪垫置于4%甲醛溶液固定24h,石蜡包埋,苏木精-伊红染色制作脂肪组织切片,制备方法与脂肪细胞面积计算方法见参考文献^[16]。

1.2.4 统计学方法

采用GraphPad Prism 6统计软件进行数据统计分析及作图。组间差异比较采用t检验,检验水平 $p < 0.05$ 认为有显著差异, $p < 0.01$ 认为有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 高脂饮食诱导小鼠体重增加的比较

试验开始前,各组小鼠体重差异无统计学意义。

试验期间,每周更换两次新鲜饲料,每三天更换一次新鲜饮水;spf CONV、spf HF、pgf CONV 和 pgf HF 各组小鼠每周摄食量分别为 214.44±6.92 g、199.59±8.86 g、191.21±29.68 g 和 164.44±14.47 g; 平均每次饮水量分别为 96.99±5.75 mL、96.24±4.07 mL、91.60±3.48 mL、96.33±3.97 mL,并且各组小鼠摄食量、饮水量无显著差异。试验 8 周后,spf CONV 组小鼠平均体重 27.82±1.21 g,spf HF 组小鼠平均体重达 34.32±2.98 g,较 spf CONV 组小鼠平均体重增加 23.36%;pgf CONV 组小鼠平均体 26.18±1.84 g,pgf HF 组小鼠平均体重达 29.23±1.29 g,较 pgf CONV 组小鼠平均体重增加 11.65%。比较伪无菌与 SPF 级小鼠体重增加情况发现摄取普通饮食的伪无菌小鼠体重明显轻于同样摄取普通饮食的 SPF 级小鼠 ($p<0.05$);且摄取高脂饮食的伪无菌小鼠体重极显著低于高脂饮食组 SPF 级小鼠 ($p<0.001$),见图 1。

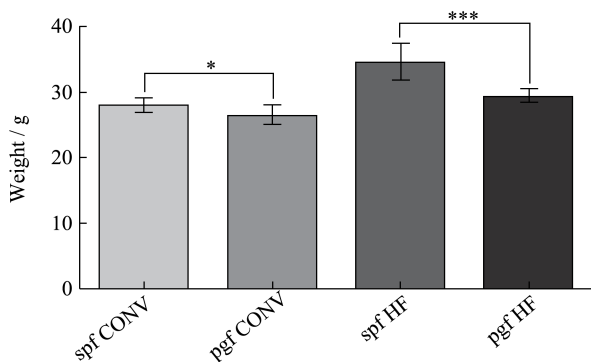


图 1 伪无菌与 SPF 级小鼠体重比较

Fig.1 Comparison of body weight of pseudo germ-free mice and SPF mice

注: *表示差异显著 ($p<0.05$); ***表示差异极显著 ($p<0.001$)。

2.2 高脂饮食诱导小鼠脂肪累积的比较

持续 8 周高脂饮食诱导小鼠肥胖,spf CONV 组小鼠平均脂肪垫和肾周脂重量为 0.26±0.05 g、0.06±0.02 g,spf HF 组小鼠平均脂肪垫和肾周脂重量达 1.26±0.39 g、0.44±0.12 g,较 spf CONV 组脂肪垫重量增加大约 4 倍,较 spf CONV 组肾周脂重量增加约 6 倍。pgf CONV 组小鼠平均脂肪垫和肾周脂重量为 0.33±0.12 g、0.06±0.03 g,pgf HF 组小鼠平均脂肪垫和肾周脂重量达 0.39±0.10 g、0.09±0.03 g,较 pgf CONV 组分别增加 18.2%和 50%。比较伪无菌与 SPF 级小鼠脂肪累积数据显示普通饮食对伪无菌与 SPF 级小鼠脂肪垫、肾周脂重量增加的差异无统计学意义,高脂饮食诱导后 SPF 小鼠脂肪垫与肾周脂重量均极显著高于伪无菌小鼠 ($p<0.0001$),见图 2。

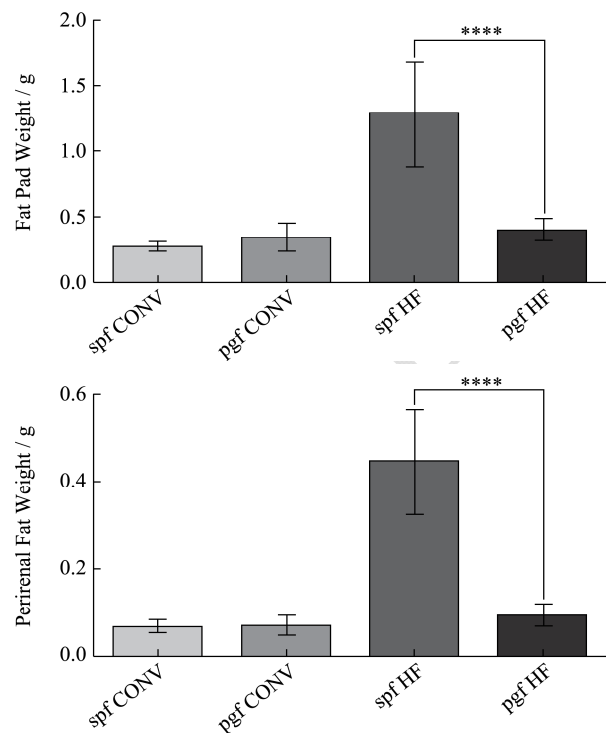


图 2 伪无菌小鼠与 SPF 级小鼠脂肪重量比较

Fig.2 Comparison of the fat pad and perirenal weights of pseudo germ-free mice and SPF mice

注: ****表示差异极显著 ($p<0.0001$)。

2.3 高脂饮食诱导小鼠血糖、血脂变化

表 1 小鼠血清血糖、血脂含量 (mmol/L)

Table 1 Serum glucose level and lipid content in mice (mmol/L)

血清	pgf CONV	pgf HF	spf CONV	spf HF
GLU	0.98±0.55	3.08±0.99 ^c	4.62±0.40	8.08±0.72 ^d
Tch	3.74±0.21	3.51±0.18	3.59±0.35	4.14±0.32 ^a
TG	1.02±0.06	0.70±0.07 ^b	0.76±0.08	0.83±0.23
HDL-C	2.55±0.15	2.40±0.13	2.39±0.22	2.58±0.15
LDL-C	0.67±0.04	0.67±0.08	0.62±0.06	0.73±0.12

注: pgf HF 与 pgf CONV 组比较, b 表示差异极显著 ($p<0.01$), c 表示差异极显著 ($p<0.001$); spf HF 与 spf CONV 组比较, a 表示差异显著 ($p<0.05$), d 表示差异极显著 ($p<0.0001$)。

检测结果表明,与 pgf CONV 组比较,高脂饮食诱导 pgf HF 组伪无菌小鼠血糖水平极显著升高 ($p<0.001$),血清甘油三酯含量显著下降 ($p<0.01$)。高脂饮食引起伪无菌小鼠血清高密度脂蛋白胆固醇降低,血清总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇较 pgf CONV 组相比无显著差异。SPF 小鼠摄取高脂饮食后,血清血糖、总胆固醇与 spf CONV 组比较差异具有统计学意义 ($p<0.0001$, $p<0.05$),血清甘油三酯、高密

度脂蛋白胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇含量与 spf CONV 组相比均有所上升,但差异无统计学意义。(见表 1)

2.4 高脂饮食诱导小鼠胰岛素变化的比较

高脂饮食诱导伪无菌与 SPF 级小鼠胰岛素水平分别较 spf CONV 组与 pgf CONV 组显著升高 ($p < 0.01$), 而伪无菌小鼠无论摄取普通饲料还是高脂饲料其胰岛素水平均极显著低于 SPF 级小鼠 ($p < 0.01$), 见图 3。

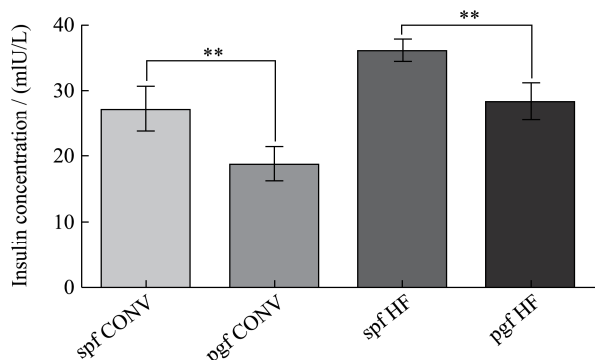


图 3 伪无菌小鼠与 SPF 级小鼠胰岛素含量比较 (mIU/L)

Fig.3 Comparison of the insulin levels of pseudo germ-free mice and SPF mice (mIU/L)

注: **表示差异极显著 ($p < 0.01$)。

2.5 高脂饮食诱导小鼠脂肪组织形态变化的比较

2.5.1 高脂饮食对伪无菌与 SPF 级小鼠脂肪组织形态影响的比较

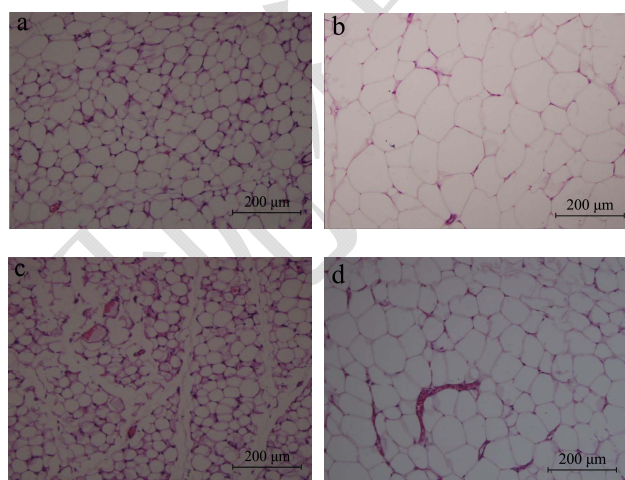


图 4 伪无菌小鼠与 SPF 级小鼠脂肪组织形态变化

Fig.4 Changes in adipose tissue morphology of pseudo germ-free mice and SPF mice

注: 图 4 分别为四组小鼠脂肪组织 HE 染色切片图; 图 A 为 spf CONV 组小鼠脂肪组织; 图 B 为 spf HF 组小鼠脂肪组织; 图 C 为 pgf CONV 组小鼠脂肪组织; 图 D 为 pgf HF 组小鼠脂肪组织。

CONV 组小鼠脂肪组织; 图 D 为 pgf HF 组小鼠脂肪组织。

伪无菌与 SPF 小鼠摄取高脂饮食后, 其脂肪细胞分别较普通饮食组出现明显的膨大现象, 同一视野下脂肪细胞个数也明显减少。pgf CONV 组与 spf CONV 的小鼠脂肪细胞大小无明显差异, 但高脂饮食诱导后 SPF 小鼠脂肪细胞远大于伪无菌小鼠。(见图 4)

2.5.2 高脂饮食诱导伪无菌与 SPF 级小鼠脂肪细胞大小变化的比较

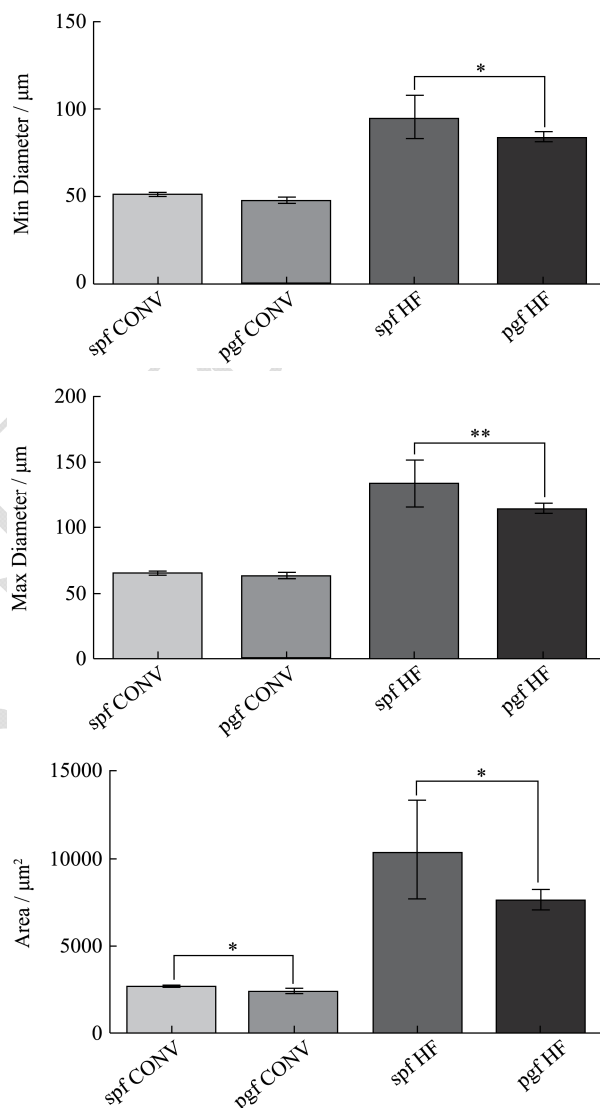


图 5 伪无菌与 SPF 级小鼠脂肪细胞大小比较

Fig.5 Comparison of adipose cell size of pseudo germ-free mice and SPF mice

注: *表示差异显著 ($p < 0.05$); **表示差异极显著 ($p < 0.01$)。

使用 Image Pro-Plus 6.0 图像处理软件测量伪无菌与 SPF 级小鼠脂肪细胞长径、短径和面积。比较数据显示, 摄取普通饮食的伪无菌与 SPF 级小鼠脂肪细胞的短径长径无显著差异, 但是 SPF 小鼠脂肪细胞面积与伪无菌小鼠比较差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)。摄取高脂饮食后伪无菌小鼠脂肪细胞长径、短径及面积

却显著小于SPF级小鼠, 比较差异具有统计学意义 ($p<0.01$, $p<0.05$, $p<0.05$), 见图5。

3 讨论

本研究中, 我们用高脂纯化饲料诱导10只SPF级8周龄的C57BL/6J雄性小鼠肥胖, 另10只SPF级8周龄的C57BL/6J雄性小鼠给予普通纯化饲料作为对照, 小鼠自由饮水。实验第4周和第8周高脂饮食组SPF小鼠体重较普通饮食组SPF小鼠体重分别增加14.16%和23.36%。实验中高脂饮食饲喂8周时, 高脂饮食组SPF小鼠的附睾脂肪垫、肾周脂肪湿重、血清GLU、Tch及胰岛素水平较普通饮食组SPF小鼠显著提高, 血清TG与LDL-C水平较普通饮食组SPF小鼠有所提高但差异无统计学意义。Tch与TG是诊断高血脂和脂肪肝的重要指标^[17], SPF小鼠的实验数据提示高脂饮食不仅有效诱导SPF小鼠体重增加和脂肪累积还诱导小鼠血脂指标上升, 预示长期摄取高脂高热量饲料的小鼠可能还会出现高血脂等症状。

此研究中, 我们还另外给予20只SPF级8周龄的C57BL/6J雄性小鼠抗生素混合物饮水剔除大部分肠道菌群, 并随机分成2组分别饲喂高脂纯化饲料和普通纯化饲料。试验期间小鼠未出现异常临床症状, 实验第4周和第8周摄取高脂饮食的伪无菌小鼠体重较普通饮食组伪无菌小鼠分别增加10.77%和11.65%。血清GLU和胰岛素水平较普通饮食的伪无菌小鼠极显著提高, 血清Tch、TG、HDL-C和LDL-C水平较普通饮食的伪无菌小鼠略有下降差异无统计学意义。

对比高脂饮食诱导伪无菌与SPF小鼠肥胖的各项数据发现, 伪无菌小鼠体重增加缓慢, 脂肪累积程度不及高脂饮食对SPF小鼠的作用明显。高脂饮食对伪无菌小鼠血清胰岛素和血脂指标的调控相对SPF小鼠而言无显著变化。伪无菌和SPF小鼠同样饲喂普通纯化饲料8周后, 脂肪细胞大小无显著差异, 而同样饲喂高脂饮食的伪无菌小鼠脂肪细胞显著小于高脂饮食的SPF小鼠。美国华盛顿大学戈登实验室早已发现相同饮食条件下SPF小鼠比无菌小鼠体内脂肪累积含量要高达42%, 饲料摄入却减少29%。给无菌小鼠接入正常小鼠的肠道菌群后, 小鼠体内脂肪含量比无菌时增加57%~90%^[18]。近期瑞士日内瓦大学科学家Suárez-Zamorano N的一项研究结果指出没有肠道菌群的动物或无菌动物会表现出更好的葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性并且还会出现低脂肪低体重指数的现象^[19]。

用抗生素混合物剔除SPF小鼠90%肠道微生物, 建立伪无菌小鼠动物模型, 小鼠经抗生素处理后盲肠较SPF小鼠变大, 盲肠内容物也多为液态状与无菌小

鼠极为相似。此外伪无菌小鼠与SPF小鼠相比无体重、器官毒性和生理变化的差异, 并有研究显示伪无菌小鼠的试验结果与无菌小鼠趋于一致^[20,21], 因此可以用伪无菌小鼠的试验结果指示无菌小鼠的试验结果。

4 结论

本研究表明, 高脂饮食显著诱导 C57BL/6J SPF小鼠体重增加和脂肪累积, 同时诱发血糖、胰岛素、血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇升高。高脂饮食诱导 C57BL/6J 伪无菌小鼠体重增加缓慢与脂肪累积程度远不及 SPF 小鼠明显, 并且对 C57BL/6J 伪无菌小鼠血糖、胰岛素及血脂指标的影响也不及 SPF 小鼠明显。C57BL/6J 伪无菌小鼠对高脂饮食的响应情况与无菌小鼠极为相似, 且伪无菌小鼠盲肠较 SPF 小鼠显著变大, 盲肠内容物多呈液态, 这也与 C57BL/6J 伪无菌小鼠相同。鉴于 C57BL/6J 伪无菌小鼠在短时间内更易获得、饲养简单及成本低, 且与无菌小鼠试验结果一致, 建立伪无菌小鼠动物模型是研究肠道菌群与宿主关系、肠道菌群与某些疾病关系等的高效快速的有益模型。

参考文献

- [1] Backhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101(44): 15718-15723
- [2] 赵立平, 赵乃思, 曾庆平. 争议肥胖: 它到底是不是一种疾病? [N]. 文汇报, 2014, 4, 25
ZHAO Li-ping, ZHAO Nai-si, ZENG Qing-ping. Dispute in obesity: Is it a disease in the end? [N]. Wenhui News, 4, 25, 2014
- [3] Samuel B S, Shaito A, Motoike T, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41 [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, 105(43): 16767-16772
- [4] 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
- [5] 赵立平, 张晨虹, 费娜, 等. 以肠道菌群为靶点的代谢病营养干预研究进展 [J]. 中国食品学报, 2014, 14(1): 1-5
ZHAO Li-ping, ZHANG Chen-hong, FEI Na, et al. Research development in gut microbiota-targeted nutritional intervention of metabolic disease [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(1): 1-5
- [6] Chang C, Lin C, Lu C, et al. Ganoderma lucidum reduces

- obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7489
- [7] Boeing H. Obesity and cancer-the update 2013 [J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013, 27(2): 219-227
- [8] Apovian C M, Gokce N. Obesity and cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2012, 125(9): 1178-1182
- [9] Dixon J B. The effect of obesity on health outcomes [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 316(2): 104-108
- [10] Grover M, Kashyap P C. Germ-free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology [J]. *Neurogastroenterology & Motility*, 2014, 26(6): 745-748
- [11] Lee S H, An J H, Lee H J, et al. Evaluation of pharmacokinetic differences of acetaminophen in pseudo germ-free rats [J]. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 2012, 33(6): 292-303
- [12] Gordon H A, Pesti L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships [J]. *Bacteriol. Rev.*, 1971, 35(4): 390-429
- [13] Reigstad C S, Kashyap P C. Beyond phylotyping: understanding the impact of gut microbiota on host biology [J]. *Neurogastroenterology & Motility*, 2013, 25(5): 358-372
- [14] Uchiyama R, Chassaing B, Zhang B, et al. Antibiotic treatment suppresses rotavirus infection and enhances specific humoral immunity [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2014, 210(2): 171-182
- [15] Bhowmik S K, An J H, Lee S H, et al. vMA Alteration of bile acid metabolism in pseudo germ-free rats [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2012: 35, 1969-1977
- [16] 胡龙.不同运动方式对Wistar大鼠肩胛棕色脂肪形态和功能的影响[D].河北师范大学,2014
- HU Long. Different exercise effect on intrascapular brown adipose tissue morphology and the function of the wistar rats [D]. Hebei Normal University, 2014
- [17] 王根辈,栗志文,曹晶,等.高脂饮食诱发大鼠营养性肥胖动物模型的研究[J].吉林医学,2012,1:5-7
- WANG Gen-bei, LI Zhi-wen, CAO Jing, et al. Study of dietary obesity in rats induced by high fat diet [J]. *Jilin Medical Journal*, 2012, 1: 5-7
- [18] Backhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101(44): 15718-15723
- [19] Suárez-Zamorano N, Fabbiano S, Chevalier C, et al. Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity [J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(12): 1497-1501
- [20] Kimura I, Ozawa K, Inoue D, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43 [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1829
- [21] Wichmann A, Backhed F, Allahyar A, et al. Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit [J]. *Cell Host & Microbe*, 2013, 14(5): 582-590