

基于 PCR-DGGE 分析抗性淀粉对高脂饮食 HFA 小鼠肠道菌群的影响

廖振林¹, 曾本华², 李瑞¹, 钟青萍¹, 王丽¹, 魏泓², 方祥¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 第三军医大学基础部实验动物学教研室, 重庆 400038)

摘要: 本文研究了香蕉抗性淀粉对高脂饮食菌群人源化小鼠 (HFA) 肠道菌群的调控效果。将 30 只肠道菌群人源化昆明小鼠随机分为 3 组 (10 只/组), 分别饲喂普通饮食、高脂饮食和高脂饮食+抗性淀粉。提取第 0 周和第 8 周新鲜粪便 DNA, 比较用 16S rDNA V6-V8 区段特异性引物扩增产物, 以 PCR-DGGE 技术手段检测抗性淀粉组、高脂饮食组和普通饮食组肠道菌群差异。第 0 周, 三组小鼠菌群总菌丰富度, 多样性指数和均匀度无显著差异 ($p>0.05$), 小鼠和粪便供者之间菌群相似性为 36%; 三组小鼠肠道菌群相似性达到 60-93%, PCA 分析显示三组小鼠的数据点都聚在一起, 说明在干预前无明显差异, 适用于分析抗性淀粉对肠道菌群的影响; 膳食干涉第 8 周后小鼠肠道菌群的多样性指数和丰富度数值, 抗性淀粉组都极显著低于高脂组和普通饲料组 ($p<0.01$), PCA 分析也显示三组小鼠肠道菌群各组的数据点都分布在不同区域, 说明抗性淀粉对高脂饮食 HFA 小鼠肠道菌群结构产生显著影响。

关键词: DGGE; 微生物多样性; 主成分分析 (PCA); 发酵; 菌群人源化小鼠 (HFA)

文章编号: 1673-9078(2015)9-1-6

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.001

PCR-DGGE Based Analysis of the Impact of Resistant Starch on Gut Microbiota in HFA Mice

LIAO Zhen-lin¹, ZENG Ben-hua², LI Rui¹, ZHONG Qing-ping¹, WANG Li¹, WEI Hong², FANG Xiang¹

(1. College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Department of Laboratory Animal Science, College of Basic Medical Sciences, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: The effects of banana resistant starch on the alteration of gut microbiota in Human Flora-Associated (HFA) mouse model fed on a high fat diet, were investigated. Thirty HFA mice were randomly assigned into three groups ($n = 10/\text{group}$), which were fed a normal diet, high fat diet, and high fat diet + resistant starch, respectively. DNA was extracted from the fresh feces of all mice, which were collected prior to the beginning of the experiment (0th week) and after eight weeks (8th week). The primer-specific amplification products using the V6-V8 region of 16S rDNA were compared and differences in the profile of gut microbiota among the resistant starch, high fat diet, and normal diet groups were tested using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). Richness, diversity index, and evenness value of gut microbiota were not significantly different between the three groups at 0th week ($p > 0.05$). Flora similarity between the mice and the human feces donor was 36%, but the flora similarity between the three mice groups ranged from 60% to 93%. Principal component analysis (PCA) showed that the data points of all three groups were clustered together, indicating no difference between the three groups before intervention and that the HFA mouse model was suitable for the investigation of resistant starch on gut microbiota. Richness and diversity index values of gut microbiota between the resistant starch group and the other two groups 8 weeks after the dietary intervention were significantly different ($p < 0.01$). PCA of the mouse intestinal bacterial community showed that data points were distributed within different zones after the dietary interventions. In conclusion, resistant starch has a huge influence on the gut bacterial community structure of HFA mice fed on a high fat diet.

Key words: denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); microbial biodiversity; principal components analysis (PCA); fermentation; human flora-associated (HFA) mice

收稿日期: 2014-11-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31171673, 31071528); 国家重点基础研究发展计划 (2013CB531406)

作者简介: 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

通讯作者: 方祥 (1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 益生元、益生菌与脂肪代谢; 魏泓 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 实验动物模型

寄居在人类胃肠道内的微生物被统称为肠道菌群。近年来,随着分子生物学技术在感染生态学上的应用,根据细菌 16S rRNA 序列的分类,肠道菌群中的 98%可归入以下四门:厚壁菌门(64%),拟杆菌门(23%),变形菌门(8%)和放线菌门(3%)^[1]。Ley^[2]等人的一项研究结果表明,肠道微生物可能影响机体能量的储存,提示肥胖可能与其有关。将正常小鼠肠道微生物(细菌)接种到无菌小鼠体内,与无菌小鼠、正常小鼠同等条件下喂饲 14 d。观察发现,与无菌小鼠相比,正常小鼠和被接种细菌后的小鼠在食物摄入减少的情况下,总体脂和附睾脂肪垫都有不同程度的增加。Turnbaugh^[3]等人的研究表明,肥胖小鼠(ob/ob)与非肥胖小鼠肠道微生物存在差异。与非肥胖小鼠相比,ob 小鼠拟杆菌的数量少 50%,同时具有更多的硬壁菌门细菌。有研究表明,肥胖小鼠(ob/ob)与非肥胖小鼠的肠道微生物落的差异可以转移和复制。与非肥胖小鼠相比,肥胖小鼠具有更高的能量吸收的效率,并且其排泄物中能量更低(摄入能量相同)。抗性淀粉能够改变结肠微生物群落,并发酵产生短链脂肪酸(short chain Fat acid, SCFA),促进肠道有益微生物(如双歧杆菌、乳酸杆菌)繁殖,降低肠道 pH 值、减少腐败物和致癌物的产生、生成 B 族维生素、促进肠道蠕动、提高人体免疫力等。

白永亮等利用香蕉抗性淀粉饲喂糖尿病大鼠,发现有助于控制糖尿病大鼠的体重增加,且能够调节糖尿病大鼠肠道菌群结构,抑制有害菌的生长,使其代谢产物 SCFA 增多^[4]。DGGE(变性梯度凝胶电泳)能将同样大小的 DNA 片段很理想地分开^[4],且 DGGE 技术避免了分离纯化培养所造成的分析上的误差,通过指纹图谱直接再现群落结构,目前已经成为微生物群落遗传多样性和动态性分析的强有力工具。本实验通过构建人源化菌群的昆明小鼠(Human flora-associated mice, HFA),以 DGGE 技术为主要技术手段,研究香蕉抗性淀粉对肠道菌群多样性的影响,特别是在有高脂食物这个不利因素的条件下,抗性淀粉仍然能够调节菌群,增加有益微生物,降低脂肪累积,为探索肠道菌群对脂肪代谢和健康的调控机理研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 原料

普通饲料含玉米 34%、黄豆粉 15%、麦麸 15%、面粉 15%、鱼粉 6%、豆饼 3%、酵母粉 1%、鸡蛋 5%、菜油 1%、骨粉 2.5%、食盐 2.5%;高脂饲料含普通饲

料 78%、猪油 15%、蛋黄粉 5%、白糖 2%;抗性淀粉饲料含 80%高脂饲料和 20%香蕉抗性淀粉(以下简称抗性淀粉饲料或者抗性淀粉组)。香蕉抗性淀粉购自佛山蕉叶科技有限公司, HFA 小鼠(实验动物生产许可证号:SYXK(渝)2012-0003)和其他原料均由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂与仪器设备

16SrNA V4、V8 区细菌引物和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)来自上海生工;50×Tris-乙酸-EDTA(TAE)缓冲液,上海捷瑞生物工程;氢氧化钠、甲醛、硝酸银、丙烯酰胺、SDS 等均为分析纯试剂;Premix Taq Version 2.0, TaKaRa 公司;磁珠碾磨仪(Mini-BeadBeater-16),美国 BioSpec;凝胶成像系统(BioSpectrum 800)和 D-codeTMUniversal Mutation Detection System,美国 Bio-Rad;PCR 仪(PTC-200),美国 MJ Research;高速冷冻离心机(BC-010-TY2265),美国 Beckman;实时定量 PCR 仪(MX3000 P),来自 Agilent。

1.3 HFA 小鼠模型的建立与饲养方法

按 Backhed^[6]的方法,将 30 只 4 周龄无菌昆明小鼠灌喂 0.3 mL 人志愿者粪便悬液,待菌群定植 3 周龄,即成人源菌群小鼠(Human Flora Associated Mice, HFA 小鼠),然后平均分成 3 组,每组雌雄各半:普通饲料组(A 组),高脂饲料组(B 组),抗性淀粉组(C 组),三组均分笼养于第三军医大学基础部实验动物学教研室无菌饲养隔离器中;饮水,饮水瓶 121 °C, 110 kPa 灭菌 30 min 备用,饲料和垫料经 50 KGy Co⁶⁰γ 射线辐照灭菌后再传入隔离器中。小鼠均每天自由饮水、摄食,昼夜时间比为 12 h:12 h,恒温 22 °C 和舒适的湿度。干预后每周称量小鼠体重(共持续 8 周),同时用逼迫法取 2~5 颗新鲜粪便样品放置于无菌的 1.5 mL 离心管内,密封并立即于 -80 °C 冻存。

1.4 粪便总 DNA 提取

粪便 DNA 的提取,根据李瑞^[7]所述的方法进行。提取完后用 RNase 去除 RNA,纯化 DNA 用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,取 1 μL 溶液用 NanoDropND-1000 核酸定量仪测定 DNA,用去离子水稀释到 200 ng/μL,储存备用。

1.5 PCR-DGGE 条件

1.5.1 V6-V8 区总菌 16S rDNA 扩增条件

V6-V8 区扩增引物参考文献^[8]。该引物预计扩增

出 489 bp 的序列。引物的序列如下：

上游引物为 968F-GC:5'-GC-clamp-AACGCGAA GAACCTTA-3'; 下游为 1401R: 5'-CGGTGTGTACA AGACCC-3'; *GC-clamp 序列为: CGCCCGCCGCGC GCGGCGGGCGGGGCGGGGACGCGGGG。PCR 条件: 反应体系 25 μ L, DNA 模板 1 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, PCR MIX 12.5 μ L, ddH₂O 补齐剩余体积; 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 S, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 S, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 S, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。

1.5.2 DGGE 电泳条件

上述 PCR 扩增产物用 DGGE 进行分析。DGGE 过程基本按文献^[9]进行。再用 0.8% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物。DGGE 使用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 梯度为 35%~60%, 上样量为 1.5 μ L。电泳采用 D-CodeTM Universal Mutation Detection System 系统, 用 1 \times TAE 作为电泳缓冲液, 加热至 60 $^{\circ}$ C, 进行 220 V 预电泳 5 min, 然后 85 V 电泳 16 h。电泳结束后使用硝酸银染色, 而后数码相机照相。

1.5.3 DGGE 特异条带的测序和分析

用无菌手术刀片切割 DGGE 胶上的特定条, 置于 1.5 mL 的离心管中, 适量无菌去离子水清洗两次, 捣碎, 加入 50 μ L 无菌去离子水, 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜; 取其上清液作为 PCR 模板, 再次扩增, V6-V8 区的引物用 U968F 和 L1401R, 引物序列除不带 GC clamp 外, 其余均与前文同。挑选与 DGGE 同一位置的阳性克隆进行测序。测序结果在 GenBank 中对比分析, 获得序列分类地位信息, 序列上传至 NCBI 获得序列登录号。

1.6 统计分析方法

试验结果利用 SPSS19.0 软件进行数据分析, 所得数据采用平均数 \pm 标准误($\bar{x}\pm s$)表示, 数据差异性检测采用方差分析, 两两比较使用 *t* 检验, $p<0.05$ 时表示差异有统计学意义。DGGE 凝胶采用 Quantity One(Bio-Rad)软件进行相似性分析, 绘制 UPGMA 相似性聚类分析图, SPSS 软件处理数据后获得 PCA 主成分图。

2 结果与讨论

2.1 第 0 周 (a) 和第 8 (b) 周小鼠粪便 V6-V8

区 DGGE 图谱

由图 1a 看出, 第 0 周时小鼠肠道菌群总菌的 DGGE 指纹图谱中, 1、2、3 号条带是 HD 有而三组

小鼠都没有的条带, 说明这 3 条带在无菌小鼠体内难以定植。4、5、6、7、8 号条带是 HD 与小鼠共有的, 而且条带较清晰, 说明是可以定植的优势菌群, 9、10 号条带是小鼠肠道有而 HD 没有的, 说明这两条条带是人肠道的弱势菌群, 但在小鼠体内得以定植。

由图 1b 可看出不同饮食干预 8 周后, 三组小鼠肠道菌群有了明显差异, 条带 2、是抗性淀粉组特有, 条带 4、6 在该组显著增强, 说明香蕉抗性淀粉组能促进这 3 种的生长, 而高脂组中出现了 1、5、7、8 号条带, 说明高脂饮食有利于这 4 种菌生长, 条带 3 在普通饲料组中的信号比在别的组强, 说明普通饲料饮食更利于它的繁殖。

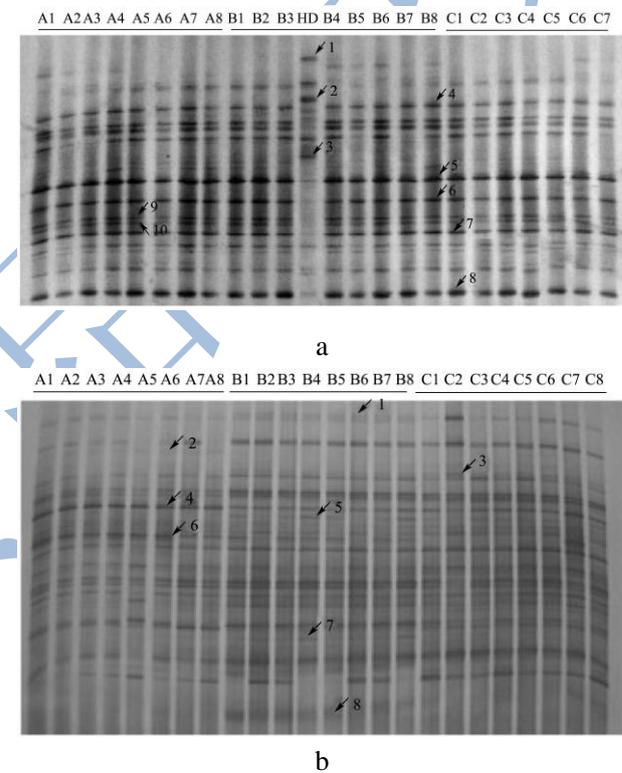


图 1 第 0 周 (a) 和第 8 (b) 周小鼠粪便 V6-V8 区 DGGE 图谱
Fig 1 DGGE profiles in mouse fecal DNA V6-V8 region at week 0 (a) and week 8 (b)

注: A1-A8 代表抗性淀粉组, B1-B8 代表高脂组, C1-C7 代表普通饲料组, HD 代表粪便捐献者。

2.2 香蕉抗性淀粉饮食对 HFA 昆明小鼠结肠

V6-V8 区总菌多样性指数的影响

从图 2a 可以看出, 第 0 周时, 三组小鼠之间肠道菌群总菌的丰富度, 多样性指数和均匀度都无显著差异 ($p>0.05$), 由图 3a 的聚类分析图可以看出, 在未干预抗性淀粉之前, 小鼠与粪便捐献者 (HD) 的相似性达到 36%, 三组小鼠的肠道菌群相似性达到

60~93%，组与组之间穿插着聚在一起，说明组内和组间相似性都极高，均一性较好。图 4a 的 PCA 分析图可以明显地看出三组小鼠的数据点都聚在一起，无明显分界线，而与粪便捐献者的粪便肠道菌群明显隔开，说明粪便定植成功，并且三组小鼠在干预前没有明显差异，适用于分析香蕉抗性淀粉对肠道菌群的影响。

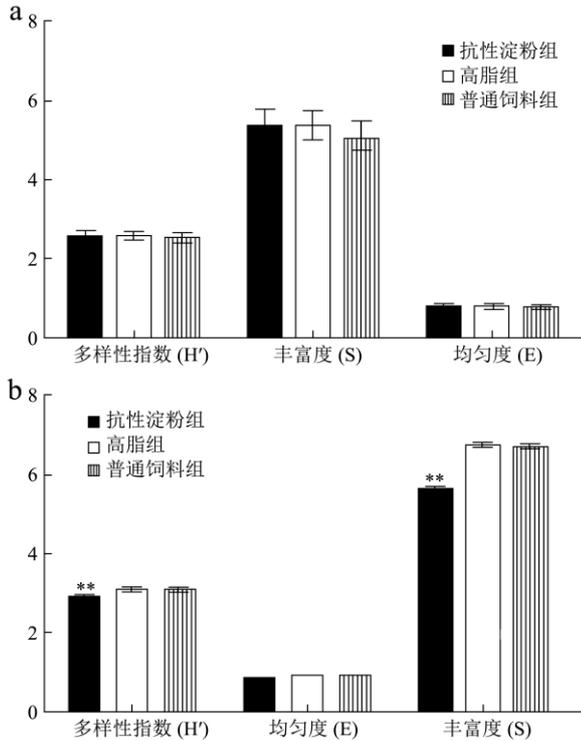


图 2 第 0 周 (a) 和第 8 周 (b) 小鼠粪便 V6-V8 区 DGGE 图谱的多样性指数

Fig 2 Diversity analysis of DGGE profiles of mouse fecal DNA V6-V8 region at week 0 (a) and week 8 (b)

注：*表示与高脂组之间有显著性差异 ($p < 0.05$), **表示与高脂组之间有极显著性差异 ($p < 0.01$)。

从图 2b 可以看出，8 周后三组小鼠肠道菌群在多样性指数和丰富度中，香蕉抗性淀粉组都极显著低于高脂组和普通饲料组 ($p < 0.01$)，说明抗香蕉性淀粉饮食能减少肠道菌群多样性和丰富度。图 3b 的聚类分析图可以看出三组小鼠基本都能以组为单位聚集在同一簇，图 4b 的 PCA 分析图可以看出三组小鼠大肠道菌群在 8 周时，各组的数据点都分布在不同区域，说明高脂饮食和香蕉抗性淀粉饮食对小鼠肠道菌群结构产生了影响。

2.3 小鼠粪便 V6-V8 区 DGGE 图谱的

UPGMA 聚类分析结果

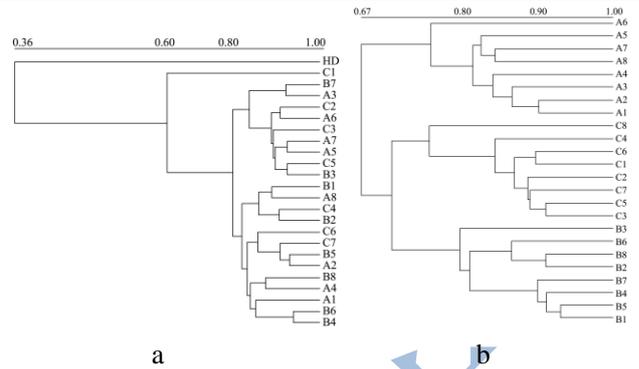


图 3 第 0 周 (a) 和第 8 周 (b) 小鼠粪便 V6-V8 区 DGGE 图谱的 UPGMA 聚类分析

Fig 3 UPGMA analysis of DGGE profiles of mouse fecal DNA V6-V8 region at week 0 (a) and week 8 (b)

2.4 第 0 周 (a) 和第 8 周 (b) 小鼠粪便 V6-V8 区 DGGE 图谱的主成分 PCA 分析

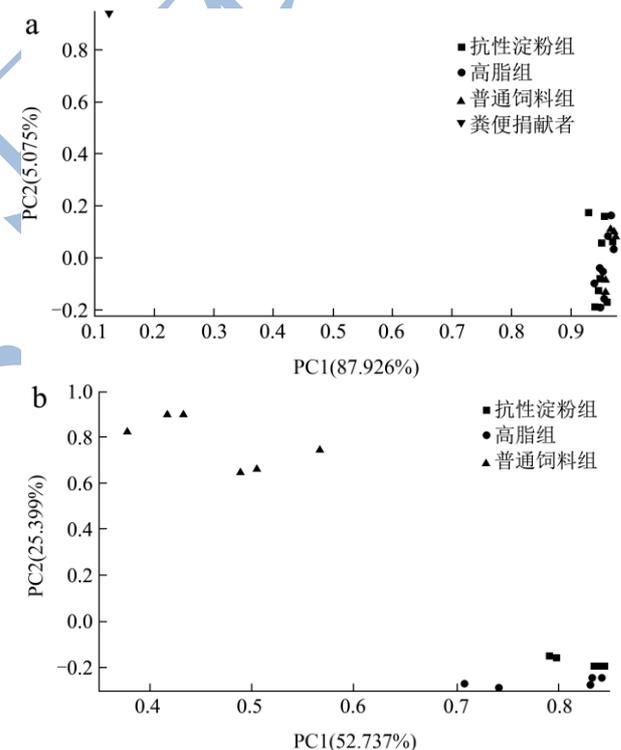


图 4 第 0 周 (a) 和第 8 周 (b) 小鼠粪便 V6-V8 区 DGGE 图谱的 PCA 分析

Fig 4 PCA analysis of DGGE profiles of mouse fecal DNA V6-V8 region at week 0 (a) and week 8 (b)

2.5 第 8 周小鼠粪便 V6-V8 区 DGGE 图谱优势条带测序分析

表 1 16S r DNA V6-V8 区 PCR-DGGE 优势条带的种属鉴定结果

Table 1 Results of PCR-DGGE preponderance bands in 16S r DNA V6-V8 region

DGGE 上条带编号	GenBank 数据库中最相近菌种名称	GenBank 序列号	相似性/%
1	<i>Dorea longicatena</i>	KC880965	94
2	<i>Roseburia hominis</i>	KC880966	94
3	<i>Clostridium clostridioforme</i>	KC880967	94
4	<i>Roseburia faecis</i>	KC880968	98
5	<i>Ruminococcus torques</i>	KC880969	95
6	<i>Turicibacter sanguinis</i>	KC880970	94
7	<i>Clostridium aldenense</i>	KC880971	99
8	<i>Blautia wexlerae</i>	KC880972	94

表 1 的测序结果来自于图 1b 的相应标注条带克隆测序, 条带 2、4、6 是抗性淀粉组特有, 测序后分类上最接近 *Roseburia hominis*、*Roseburia faecis* 和 *Turicibacter sanguinis*。而高脂组中出现的 1、5、7、8 号条带测序后分类上最接近 *Dorea longicatena*、*Ruminococcus torques*、*Clostridium aldenense* 和 *Blautia wexlerae* 大多属于球状梭菌群(梭菌簇 XIVa)。所测 8 个条带均属于厚壁菌门梭菌纲。

3 结论

3.1 本实验动物模型采用了菌群人源化(HFA)小鼠作为实验对象, 这样避免了普通小鼠的肠道菌群代谢活性和组成与人体肠道之间存在太大差异, 为了确定人体肠道内的菌群对疾病、肥胖和健康的影响, HFA 小鼠模型是一个明智的选择^[10]。HFA 小鼠模型已经在研究肠道菌群和脂肪代谢中得到广泛应用, 是因为它在实验过程中可以控制动物饮食和环境影响, 保证动物的肠道菌群与人类相似, 考虑到了宿主代谢与肠道生理环境, 同时避免了用健康人体作为研究对象的伦理问题。根据文献显示, 健康志愿者的肠道中的优势菌群在 HFA 小鼠肠道中成功定植并且在小鼠后代传递过程中也比较稳定地维持^[11], 但是, 传统的活菌计数方法无法对肠道大量存在却无法培养的细菌进行检测, 因此结果比较片面。基于 16S rRNA 基因的指纹图谱技术, 如荧光定量 PCR、PCR-DGGE 等提高了检测技术的可靠性和敏感性^[12]。许多研究表明虽然 HFA 小鼠模型的肠道菌群来自粪便捐献者的个体肠道菌群, 但宿主不同时, 优势菌群会出现差异, 说明宿主对肠道菌群有选择性作用, 这可能与和饮食结构改变与肠道环境有关。Licht^[13]利用 PCR-DGGE 技术也得出小鼠肠道对粪便捐献者肠道菌群有选择性作用。

3.2 本实验中, 由于香蕉抗性淀粉能够抵抗胃液液和小肠中各种淀粉酶的消化分解, 只能在肠道菌群的作用

下, 在结肠中被分解为短链脂肪酸, 类似于体内厌氧发酵过程, 其发酵产生的短链脂肪酸(SCFA)不仅为结肠上皮细胞提供营养, 而且也可以促进肠道益生菌的生长与繁殖^[3]。采用 16S rRNA V6 区段检测总菌群, DGGE 图谱显示粪便捐献者的肠道细菌可以在无菌小鼠体内定植, 粪便捐献者与 HFA 小鼠的肠道总菌相似性达到 36%, 说明 HFA 小鼠模型成功构建, 可作为研究抗性淀粉对肠道菌群的影响良好人源菌群(HFA)动物模型。研究表明, 抗性淀粉组的小鼠肠道菌群丰富度和多样性指数显著减少($p < 0.01$), 郭应龙^[14]等用 RS4 型抗性淀粉对 C57BL/6J 小鼠饮食进行干预, 得到结果是抗性淀粉组的多样性指数升高, 这可能是与小鼠类型不同或者菌群来源不一致有关。聚类分析图中显示三组小鼠的肠道菌群各自成簇, 说明高脂饮食和抗性淀粉饮食均能改变小鼠肠道菌群结构。对 V6 总菌群的 DGGE 图谱上的特异条带进行割胶测序, 结果发现抗性淀粉组的小鼠肠道内条带 4 的颜色比别的深, 说明抗性淀粉饮食可以促进 *Roseburia faecis* 的生长, 这种菌是瘤胃中的优势菌, 它产生的丁酸具有促进瘤胃粘膜修复, 抑制炎症反应等作用^[15]。从人粪便来源的 *Roseburia* 属的这 2 株菌种主要产生丁酸或者只产生丁酸, 是结肠重要营养菌, 本实验通过 DGGE 测到的这 2 个菌都是丁酸产生菌, 且能够促进宿主菌的免疫力^[16-17]; 缺少这类菌后, SCFA 产量降低, 容易促成肥胖^[3]。

3.3 高脂饮食促发了 *Dorea longicatena* 的生长, 这种菌属于厚壁菌门; 研究显示, 厚壁菌门与肥胖有着密切联系, 在肥胖人体常肠道内, 厚壁菌门明显增加^[18]。高脂组中还出现了 *Clostridium aldenense*, 这是一种致病菌, 与菌血症以及腹腔内感染密切相关^[19]。这几种菌在抗性淀粉组中逐渐消失, 说明香蕉抗性淀粉可以抑制这些菌的生长, 对人体肠道健康有着一定的保护作用。

3.4 本研究结果,与高脂饲料组比较,香蕉抗性淀粉+高脂饲料组 HFA 小鼠结肠菌群多样性显著降低。这一结果与预期完全相反。一般来说,多样性越高,生态系统越稳定。微生物多样性保证微生物群体中功能冗余,从而确保了在群体多样性的发生改变时关键过程不受影响,但在肠道中,微生物数量巨大,但其种及以上水平的多样性并未按比例增加,只是在亚种水平的多样性足够多的基因组和转录组用于维持肠道生态系统的回复。另外,宏观生态学研究表明,如果个体物种含有广泛的应答能力,那么就只需要少量的多样性,就能够维持系统的稳定性。多形拟杆菌的高度适应性和高度变异性能够适应:(1)变化的饮食条件稳定微生物自身的食物网,(2)变化的免疫条件和噬菌体选择压力,保证自己不被淘汰,从而保持生态稳定^[20]。在人体肠道中,可能正是这样一些优势种群保证了肠道微生物生态种群在相对低多样性的情况下,维持了其长期稳定性。因此,本实验中高脂饮食+抗性淀粉组 DGGE 图谱显示多样性降低的可能原因:1)未能真实体现 HFA 小鼠结肠菌群菌株水平多样性;2)多样性有所降低,但某种或某些具有广泛应答能力的种系出现。DGGE 图谱中高脂饮食+抗性淀粉组 2、4、6 号条带所代表的三种菌明显增加,是否就是代表广泛应答能力的菌株,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 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
- [2] Ley R E, Backhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2005, 102(31): 11070-11075
- [3] Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins [J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 480-484
- [4] 白永亮,彭真福,陈庆发,等.香蕉粉干预对糖尿病大鼠肠道菌群调节作用研究[J].*现代食品科技*, 2013,9:2110-2114
- [5] Davis L M, Martinez I, Walter J, et al. A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults [J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010,144(2):285-292
- [6] Backhed F, Manchester J K, Semenkovich C F, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2007, 104(3): 979-984
- [7] 李瑞,廖振林,方祥,等.抗性淀粉对 HFA 小鼠肠道菌群的影
- 响[J].*中国微生态学杂志*,2013,7:762-765
- LI Rui, LIAO Zhen-lin, FANG Xiang, et al. Effects of resistant starch on intestinal microflora in HFA-kunming mice [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2013, 7: 762-765
- [8] Nubel U, Engelen B, Felske A, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacilluspolymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis [J]. *J. Bacteriol.*, 1996, 178(19): 5636-5643
- [9] Rowan R, Powers D A. A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses [J]. *Science*, 1991, 251(4999): 1348-1351
- [10] Overland M, Granli T, Kjos N P, et al. Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs [J]. *J. Anim. Sci.*, 2000, 78(7): 1875-1884
- [11] Lofmark S, Jernberg C, Jansson J K, et al. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes [J]. *J. Antimicrob Chemother*, 2006, 58(6): 1160-1167
- [12] 袁静.两种微生态学动物模型的建立及其在抗菌药物残留安全评估中的应用研究[D].重庆:第三军医大学,2009
- YUAN Jing. Application of human flora-associated mice model and infant mice model in evaluation of antimicrobial residues in food for their potential risk to affect human intestinal microflora [D]. Chongqing: the Third Military Medical University, 2009
- [13] Licht T R, Hansen M, Poulsen M, et al. Dietary carbohydrate source influences molecular fingerprints of the rat faecal microbiota [J]. *BMC Microbiol.*, 2006, 6: 98
- [14] 郭应龙,王文婷.RS4 型抗性淀粉对高脂饮食 C57BL/6J 小鼠肠绒毛形态及肠道菌群的影响[J].*食品科学*,2013,21: 333-338
- WU Ying-long WANG Wen-ting. Effect of RS4-type Resistant Starch on Intestinal Villus Morphology and Small Intestinal Flora in High-fat Diet-fed C57BL/6J Mice [J]. *Food Science*, 2013, 21:333-338
- [15] Duncan S H, Aminov R I, Scott K P, et al. Proposal of *Roseburiafaecis* sp. nov., *Roseburiahominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from human faeces [J]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, 56(Pt 10): 2437-2441
- [16] Hatzioanou D, Mayer M J, Duncan S H, et al. A representative of the dominant human colonic Firmicutes, *Roseburia faecis* M72/1, forms a novel bacteriocin-like

- substance [J]. *Anaerobe*, 2013, 23, 5-8
- [17] Machiels K, Joossens M, Sabino J, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2014, 63: 1275-83
- [18] Cani P D, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice [J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1470-1481
- [19] Williams O M, Brazier J, Peraino V, et al. A review of three cases of *Clostridium aldenense* bacteremia [J]. *Anaerobe*, 2010, 16(5): 475-477
- [20] Banfield J F, Young M, Microbiology. Variety-the splice of life-in microbial communities [J]. *Science*, 2009, 326: 1198-9
- [21] Huang C, Xiong C, Kornfeld K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2004, 101: 8084-8089
- [22] Gruber J, Tang S Y, Halliwell B. Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, 1100: 530-542
- [23] Houthoofd K, Johnson T E, Vanfleteren J R. Dietary restriction in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences*, 2005, 60(9): 1125-1131