

枸杞多糖对过敏性哮喘小鼠肠道菌群的影响

崔芳¹, 史春丽¹, 尹梅², 高小平³, 王立英⁴, 何斌⁴, 赵巍¹, 赵嘉庆¹

(1. 宁夏医科大学基础医学院, 宁夏银川 750003) (2. 宁夏医科大学总医院呼吸内科, 宁夏银川 750004) (3. 宁夏医科大学总医院耳鼻咽喉头颈外科, 宁夏银川 750004) (4. 宁夏森淼枸杞科技开发有限公司, 宁夏银川 750000)

摘要: 探讨枸杞多糖 (*Lycium barbarum* Polysaccharide, LBP) 对过敏性哮喘小鼠肠道菌群的影响。本研究将 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组: 空白对照组、过敏性哮喘模型组与 LBP 干预哮喘疾病组。在 LBP 干预 7 周后, 分别观察了小鼠的常规状况, HE 染色检测了肺组织病理改变, 16 S rRNA 测序分析了肠道菌群的多样性改变。研究结果表明, LBP 干预小鼠哮喘表现显著缓解, 呼吸急促的程度较轻, 无口唇爪甲黯淡。HE 病理染色表明, LBP 干预后炎症细胞浸润显著减少, 病理损伤明显减轻。为了进一步研究相关机制, 又检测了 LBP 干预后的肠道菌群的多样性改变。测序分析结果表明, LBP 干预哮喘疾病组显著改变了肠道菌门水平的厚壁菌门 ($p=0.0351$) 和拟杆菌门 ($p=0.0015$); 在菌群属水平上显著改变了乳酸菌属 ($p=0.0105$)、梭菌属 ($p=0.0027$)、拟杆菌属 ($p=0.0385$) 与 Alistipes 菌属 ($p=0.0467$)。结果说明, LBP 改善过敏性哮喘并改变了肠道菌群的组成, 可能丰富哮喘的发病机制与提供新的防治手段。

关键词: 哮喘; 枸杞多糖; 肠道菌群; 高通量测序

文章编号: 1673-9078(2019)09-67-73

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.007

Effect of *Lycium barbarum* Polysaccharide on Gut microbiota in Allergic Asthmatic Mice

CUI Fang¹, SHI Chun-li¹, YIN Mei², GAO Xiao-ping³, WANG Li-ying⁴, HE Bin⁴, ZHAO Wei¹, ZHAO Jia-qing¹

(1. Basic Medical College of Ningxia Medical University, Yinchuan 750003, China)

(2. Department of Respiratory Medicine, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

(3. Otolaryngology Head and Neck Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

(4. Ningxia Senmiao Goji Technology and Development Co. Ltd., Yinchuan 750000, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effect of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on intestinal flora in allergic asthmatic mice. Firstly, C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: blank control group, allergic asthma model group and LBP intervention group. After 7 weeks of LBP intervention, routine status of mice was observed; pathological changes of lung tissue were detected by HE staining; and intestinal flora diversity was analyzed by 16 S rRNA sequencing. The results showed that after LBP intervention, the asthmatic performance of the mice was significantly relieved, and the degree of respiratory mitigation was mild, and there was no sputum purpura. To further investigate the mechanism, we detected the diversity of intestinal flora after LBP intervention. Sequencing and analysis showed that LBP intervention significantly changed the intestinal *Firmicutes* ($p=0.0351$) and *Bacteroides* ($p=0.0015$) in asthmatic mice, and significantly changed the genera of *Lactobacillus* ($p=0.0105$), *Clostridium* ($p=0.0027$), *Bacteroides* ($p=0.0385$) and *Alistipes* ($p=0.0467$). In conclusion, LBP improved allergic asthma and changed the composition of gut microbiota, which may enrich the knowledge of asthma pathogenesis and provide new prevention and treatment methods.

Key words: asthma; *Lycium barbarum* polysaccharide; gut microflora; high-throughput sequencing

过敏性哮喘是一种慢性炎症性疾病, 对公众健康构成严重威胁。统计数据显示, 全球至少有 3 亿人患

收稿日期: 2019-04-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30021702); 宁夏回族自治区科技支撑项目 (2015BY033)

作者简介: 崔芳 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 感染与免疫

通讯作者: 赵嘉庆 (1973-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 感染与免疫

有哮喘。据估计, 到 2025 年, 全球将增加 1 亿哮喘患者。过敏性哮喘的主要特征是气道高反应性^[1,2]。当机体接触变应原时, 嗜酸性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞被激活, Th2 细胞增多, 继而激活 B 细胞, 产生大量的 IgE。而 IgE 与肥大细胞和嗜碱性粒细胞结合, 从而促使肥大细胞脱颗粒, 分泌组胺、白三烯、前列腺素等大量炎症介质, 导致气道平滑肌收缩、血管扩

张通透性增加、黏液分泌增加,使气道变窄引起哮喘发作^[3-5]。

目前研究发现^[6],肠道微生物群在保持健康和过敏性哮喘的发生发展中起着重要作用。有研究显示^[7],肠道中的特定微生物物种可能在过敏性哮喘发展中起保护或致病作用。有结果表明^[8]肠道微生物群通过某些机制可能使免疫细胞极化,如T辅助细胞,这些细胞可促进或有利于过敏性炎症的发展。有研究显示^[9,10]乳酸杆菌、双歧杆菌等益生菌可能通过减少卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)过敏模型中的气道高反应性和相关的Th2反应介导的免疫瀑布级联反应,来减轻过敏反应治疗哮喘。例如,乳酸杆菌可以抑制IL-12和IFN- γ ,来减少IgE的产生,起到改善过敏性哮喘的作用。

枸杞是一种传统的中草药,具有多种生物活性和药理作用。它主要用来治疗高脂血症^[11]、糖尿病^[12]及癌症^[13]等疾病。枸杞多糖(Lycium barbarum Polysaccharide, LBP)是由枸杞的干燥成熟果实经脱脂、水提、反复醇沉所得,是枸杞的主要活性成分。枸杞多糖是由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、鼠李糖6种单糖成分组成,并含有多种微量元素和氨基酸,具有抗应激、抗衰老、抗疲劳、抗氧化、降血脂、增强免疫力的作用^[14,15]。有文献报道LBP已被证明是双歧杆菌和乳酸杆菌的新型益生元的候选物^[16]。目前枸杞多糖与过敏性哮喘的研究国内外尚未见报道。本研究是为了探讨LBP对过敏性哮喘小鼠肠道菌群的影响,可能会对丰富哮喘的发病机制,为哮喘的防治手段提供新的线索。同时,为LBP的健康作用的开发提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

1.1.1 实验动物

实验动物均为C57BL/6小鼠,雌性,6~8周龄,平均体重18~22 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供(合格证号:SCXK京2016-0006)。实验动物均符合动物伦理委员会的要求,小鼠饲养于SPF级的动物房内,由高压灭菌处理的饮用水和饲料进行喂养。

1.1.2 材料与试剂

本项目使用的枸杞多糖(从枸杞果实中提取的,含量为31%,浓度为1200 mg/mL)由宁夏森淼科技集团股份有限公司提供;卵清蛋白(OVA),由Sigma公司提供;氢氧化铝凝胶,由Thermo公司提供;苏木素伊红(HE)染色试剂盒,由北京索莱宝科技有限公司提供。

1.2 仪器与设备

蒸汽灭菌高压锅LDZX-75KBS,山东博科科学仪器有限公司;制冰机JP-100P,上海继谱电子科技有限公司;超净工作台SJ-CJ-2FD,苏洁医疗有限公司;-80℃低温保存箱MDF-U500VX,上海凌仪生物科技有限公司;电子分析天平ESJ-A,沈阳龙腾电子有限公司;光学显微镜BX43,深圳市三利化学有限公司;生物组织自动包埋机KH-BL,湖北孝感阔海医疗科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 构建OVA诱导的哮喘小鼠模型

小鼠在第14、21和28 d腹腔注射200 μ L(内含100 μ g OVA与4 mg氢氧化铝)致敏;第35 d至第41 d,用50 μ L的OVA溶液(浓度为1 mg/mL)滴鼻处理,随后每两d用50 μ L的OVA溶液(浓度为1 mg/mL)滴鼻一次,并持续至实验第50 d,完成过敏性哮喘模型的构建。

1.3.2 实验分组

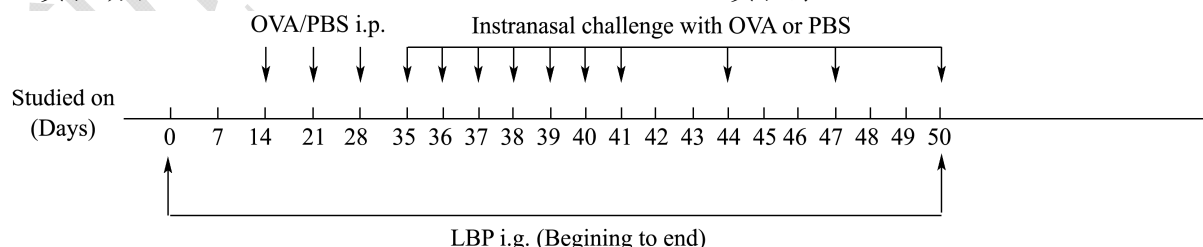


图1 小鼠哮喘模型制备示意图

Fig.1 Schematic diagram of the preparation of mouse asthma model

将45只SPF级的雌性C57BL/6小鼠随机分成3组(n=15):空白对照组(B),过敏性哮喘模型组(AN),LBP干预哮喘疾病组(AY)。按图1的方法进行干预,灌胃剂量为100 μ g/(g·d)。每日观察干预后小鼠的神

志、精神、食欲、活动等体征。

1.3.3 小鼠粪便收集

模型构建成功后,次日将小鼠并转移到新鲜的灭菌笼中,每笼一只。分别在灭菌管中收集来自每只小

鼠的新鲜粪便 0.5 g, 并且在收集期间将灭菌管置于冰上。收集后立即将其冷冻至液氮, 最后在 -80°C 下储存直至 DNA 提取。

1.3.4 HE 染色

在处死小鼠后, 立即将肺组织固定在 4% 多聚甲醛中, 常规脱蜡至水。用 HE 的试剂盒染色。在光学显微镜下观察每个切片, 并找到用于病理学分析的代表性图像, 评估小鼠气道、血管周围和肺泡细胞中炎症细胞的浸润。

1.3.5 16 S rRNA 高通量测序分析

根据参考文献描述的方法^[17-21], 使用十六烷基三甲基溴化铵法进行总基因组 DNA 提取。确定提取样本 DNA 浓度和纯度后, 使用无菌水将 DNA 稀释至 $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。使用条形码索引引物 (341F 和 806R), 通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增 16 S 核糖体 DNA 基因的 V3 和 V4 区域。经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离条带后, 使用 Gene JETTM Gel 进行 PCR 产物的纯化。使用 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 生成测序文库。该文库在 Ion S5TMXL 平台上测序, 并且生成 400~450 bp 的单端读数。在特定的过滤条件下进行以获得高质量的有效读数。通过 Uparse 软件进行序列分析, 并且将 $\geq 97\%$ 的同一性分配给相同的操作分类单元 (OTU)。筛选每个 OTU 的代表性序列。最后, 将每个样品的数据标准化, 进行 OUT 聚类分析、Alpha 和 Beta 多样性分析、菌群差异分析等^[22-24]。

1.3.6 统计学分析

所有数据经 SPSS 20.0 统计软件和 Graphpad Prism 5 软件进行数据统计和图表制作, 实验结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组之间采用单因素方差分析, 若有统计学意义, 则进行两组之间比较, 采用 LSD-t 检验。 $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 LBP 可改善过敏性哮喘小鼠的常规状况

C57BL/6 小鼠在 OVA 滴鼻激发第 7 d 出现打喷嚏、烦躁好动、抓耳挠腮等症状。三组动物症状表现结果显示: 和空白对照组相比, 过敏性哮喘模型组小鼠出现毛发黯淡倒竖、呼吸频率加快及口唇爪甲黯淡紫绀等症状; LBP 干预哮喘疾病组的小鼠哮喘表现程度明显轻于过敏性哮喘模型组, 毛发相对柔顺有光泽、呼吸频促的程度较轻、口唇爪甲黯淡紫绀程度较轻。从小鼠的常规状况来看, 过敏性哮喘模型组的哮喘症状程度最重, 而经过 LBP 干预后, 小鼠的整体状态明显好于过敏性哮喘模型组, 这提示 LBP 能够改善过敏

性哮喘, 对哮喘症状具有一定程度的缓解作用。

2.2 LBP 可减轻过敏性哮喘小鼠的肺组织病理学损伤

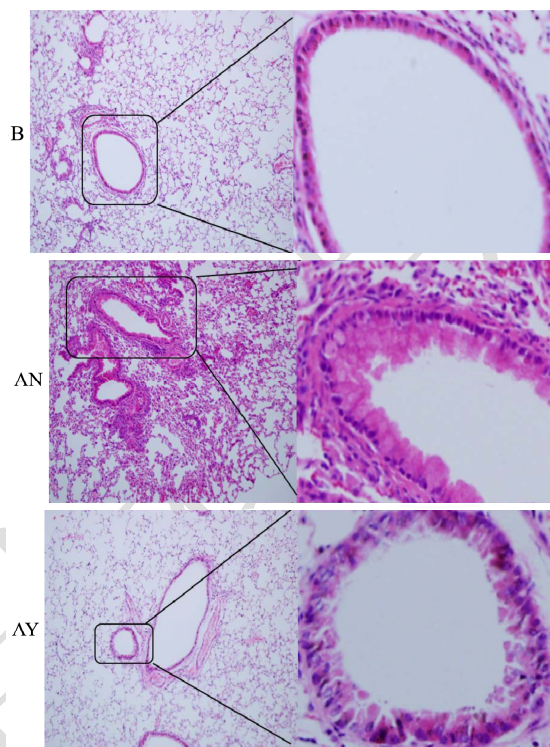


图 2 LBP 干预对肺组织病理学改变的影响 (左 $\times 200$, 右 $\times 400$)

Fig.2 The effect of LBP intervention on pathological changes in lung tissue (left $\times 200$, right $\times 400$)

小鼠肺组织切片病理染色结果如图 2 所示, 与空白对照组相比, 过敏性哮喘模型组小鼠的气管、支气管、肺泡及血管周围可见大量的嗜酸性细胞和淋巴细胞等浸润、肺组织结构不完整、黏膜上皮增生明显、气道上皮损伤严重及肺泡间隔增厚等病理表现。而 LBP 干预哮喘疾病组的病理损伤程度较过敏性哮喘模型组明显减轻, 肺组织及周围的炎症细胞浸润明显减少、肺组织结构相对完整、黏膜上皮轻度增生、气道上皮损伤减轻及肺泡间隔增厚程度减轻。因此, 可以说 LBP 具有改善过敏性哮喘的作用。在哮喘的发生发展过程中, 当机体接触到变应原时, 炎症细胞、气道上皮损伤和肺泡间隔肥厚等由此开始形成, 并且出现气道平滑肌收缩及血管通透性增加等病理表现, 这与之前的文献报道的相一致^[25]。而 LBP 可以通过减少肺组织的炎症细胞浸润、减轻气管、支气管和气道上皮损伤以及减少肺泡间隔的厚度, 即从过敏反应的“始发站”开始减缓哮喘的进程。

2.3 LBP 对肠道菌群的影响

2.3.1 OTU 分析

为研究各组样本的物种组成,测量每个样本平均 82,322 个读数,通过质量控制获得 77,376 个有效数据,质量控制效率为 94.04%。将序列聚类成具有 97%一致性的 OTU。根据聚类得到的 OTUs 分析结果(图 3),可以看到三组样品中共有的 OTU 数目是 564 个,空白对照组、哮喘模型组及 LBP 干预组特有的 OTU 数目 29 个、36 个、40 个。空白对照组和哮喘模型组共有的 OTU 数目为 480 个,空白对照组与 LBP 干预组共有的 OTU 数目为 479 个,哮喘模型组与 LBP 干预组共有的 OTU 数目为 524 个。由此可以看出,哮喘模型中的菌群 OTU 与对照组具有显著差别,而 LBP 干预哮喘后肠道菌群发生了显著变化。

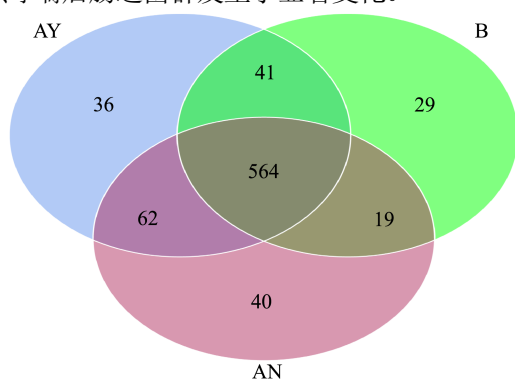


图 3 在不同的样品中基于 OTU 的 Venn 图

Fig.3 OTU-based Venn diagram in different samples

2.3.2 物种 Alpha 多样性分析

稀疏曲线结果如图 4 所示,当测序数量达到 10000 时,曲线趋向平坦,说明本次测序数据量合理。当测序数量达到 20000 时,说明测序量足够,能够基本覆盖所有物种,更多的数据量也只会产生极少量新的物种(OTUs)。在物种丰富度方面,LBP 干预哮喘疾病组的最高,过敏性哮喘模型组次之,空白对照组最低;在物种分布均匀度方面,各组差异无统计学意义。我们在等级聚类曲线中也得到了类似结果。如图 5 所示,在水平方向上,通过曲线的宽度反映了物种的丰富度,LBP 干预哮喘疾病组的曲线在横轴上的跨度最大,则表明 LBP 干预哮喘疾病组物种丰富度最高;在垂直方向上,三组曲线平滑度基本类似,则表明三组样本中的物种均匀。根据以上结果推断,过敏性哮喘模型组物种丰富度高于空白对照组,可能与哮喘小鼠肠道屏障功能减弱,肠道菌群比例失调如益生菌数量减少及机会菌大量繁殖等有关^[26];LBP 干预哮喘疾病组的物种丰富度高于其他组,可能是由于 LBP 的干预调节了肠道菌群,减轻了哮喘小鼠的肠道菌群失调,丰富了

肠道菌群的物种构成,改善了肠道菌群的多样性。

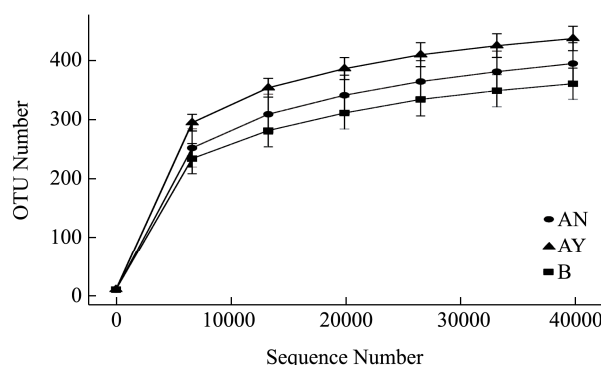


图 4 小鼠粪便菌群的稀疏曲线

Fig.4 Rarefaction curve of mouse fecal microflora

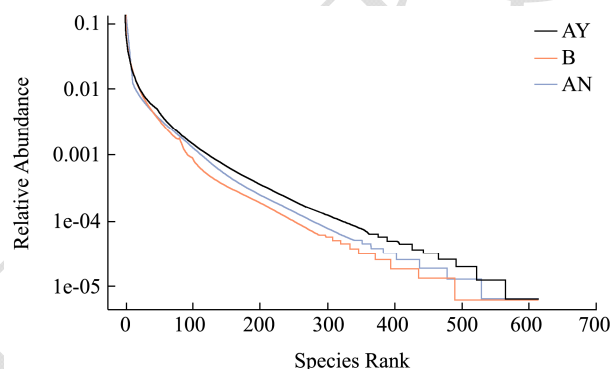
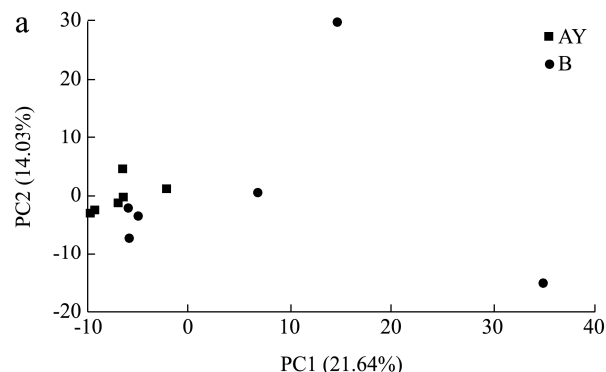


图 5 小鼠粪便菌群的等级丰度曲线

Fig.5 Rank Abundance curve of mouse fecal microflora

2.3.3 物种 Beta 多样性分析

PCA 结果如图 6a 所示,LBP 干预哮喘疾病组和空白对照组在 PCA 图中的距离接近,表明它们的群落组成较相似,菌群组成差异不是很大,说明可能是 LBP 能够纠正哮喘小鼠的肠道菌群,使之接近于空白对照。通过观察图 6b 可得,空白对照组和哮喘模型组之间的距离相对偏远,表明细菌群落组成存在着差异,说明哮喘疾病严重影响了正常小鼠肠道菌群的构成。如图 6c 所示,哮喘模型组与 LBP 组之间的距离较远,表明细菌群落的主要组成差异明显,说明 LBP 干预后显著影响了过敏性哮喘的肠道菌群组成。



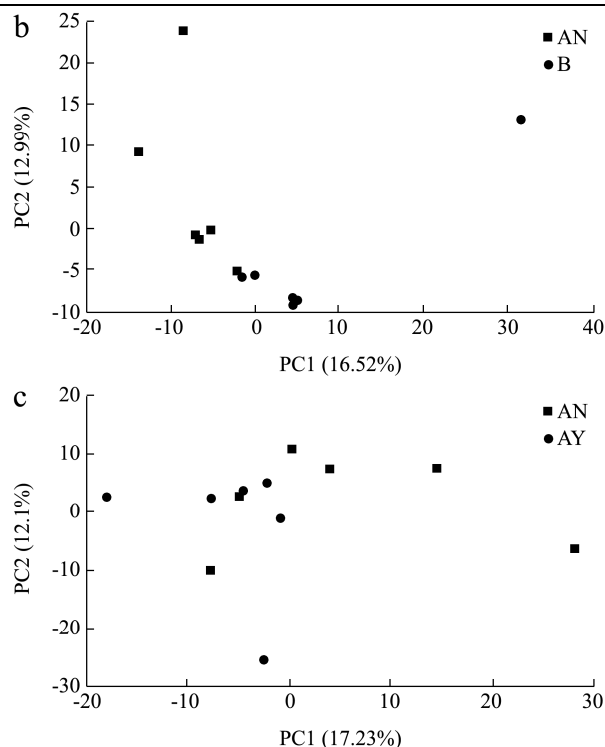


图6 主成分分析 PCA

Fig.6 Unifrac PCA

2.3.4 物种菌群结构分析

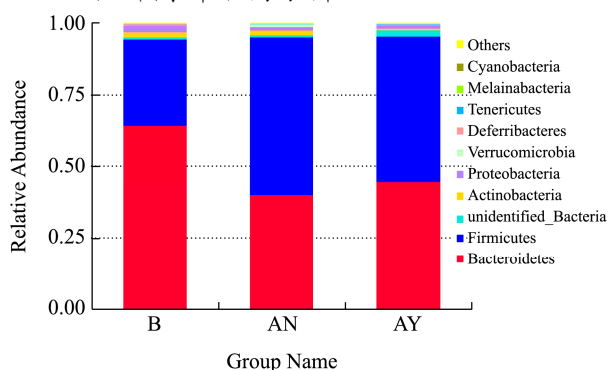


图7 小鼠粪便中微生物菌群在门水平上的相对丰度

Fig.7 The relative abundance of microbial species in phylum

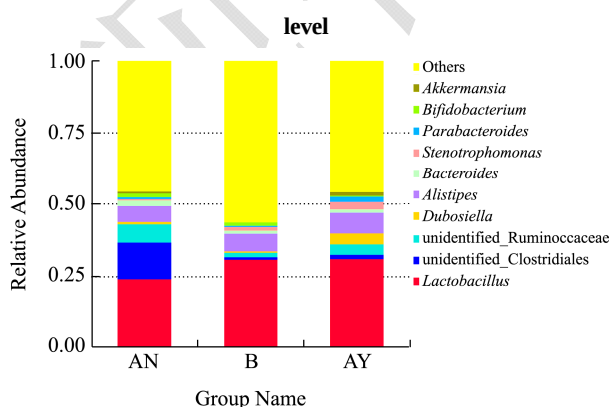


图8 小鼠粪便中微生物菌群的属水平上的相对丰度

Fig.8 The relative abundance of microbial species in genus level

为了进一步了解 LBP 对哮喘中肠道菌群组成的

影响,做了门和属水平上的微生物状况的相关分析。通过观察图7可得,三组小鼠粪便菌群中主要占优势的菌门包括厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门(Proteobacteria)。与过敏性哮喘模型组相比,LBP干预哮喘疾病组小鼠粪便菌群的菌门比例降低,包括拟杆菌门(Bacteroidetes) ($p=0.0015$)、疣微菌门(Verrucomicrobia) ($p=0.0473$)及放线菌门(Actinobacteria) ($p=0.0440$),而比例增高的为厚壁菌门(Firmicutes) ($p=0.0351$)。通过观察图8可得,优势菌属为乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、梭菌属(*unidentified_Clostridiales*)和Alistipes菌属。与过敏性哮喘模型组相比,LBP干预哮喘疾病组的Alistipes菌属比例降低($p=0.0468$)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)比例显著升高($p=0.0105$)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)比例升高($p=0.0026$)、梭菌属(*unidentified_Clostridiales*)比例明显降低($p=0.0027$)、艾克曼氏菌属(*Akkermansia*)比例升高($p=0.0386$)。

菌群结构分析结果显示,LBP可以有效促进乳酸杆菌和双歧杆菌的增殖,这与之前的文献报道相一致^[16]。目前已经有大量的研究表明^[27,28],乳酸杆菌属具有维护肠道屏障的作用,通过阻止致病菌的定植与粘附,来维持正常的肠道菌群平衡。同时,研究发现^[29],乳酸杆菌属能够调节肠道内的免疫反应,通过行使免疫功能,影响肠道炎症的发生和发展。LBP可以促进双歧杆菌的增殖,双歧杆菌属于放线菌门,具有增强免疫力、调节肠道菌群的作用。Alistipes菌属为致病菌,可对肠道起到一定的致炎作用^[30]。而该菌属在过敏性哮喘模型组的比例较高,说明Alistipes菌属可能参与哮喘疾病的发生发展。梭菌属,多为革兰阴性杆菌,大多数为专性厌氧,梭菌属和哮喘的相关报道显示^[31],该菌属可促进结肠调节性T细胞积累和降低卵白蛋白特异性IgE水平。这与我们的研究结果相一致,可以得知梭菌属的显著改变在哮喘疾病的发生发展过程中起到了一定的作用。而相对于哮喘模型组,LBP干预后的艾克曼氏菌属比例升高。该菌属具有潜在的抗炎作用,并且对调节宿主代谢紊乱有着积极的作用^[32]。由此说明,LBP干预可以调节哮喘小鼠的肠道菌群,使更多的有益菌成为优势菌群,抑制有害菌的增殖,从而维持了哮喘小鼠的肠道健康。

3 结论

通过对过敏性哮喘小鼠进行LBP干预,观察并记录其常规状况,发现LBP干预可以缓解过敏性哮喘小鼠的烦躁好动、毛发黯淡倒竖、呼吸频率加快等症状。

通过病理学结果可知, LBP 可以明显减轻病理损伤, 显著减少炎症细胞的浸润。通过对小鼠的粪便菌群进行高通量测序分析, 发现 LBP 干预的小鼠肠道菌群丰度较未干预的小鼠有所增加, 菌群结构发生改变, 说明 LBP 对过敏性哮喘小鼠的肠道起到调节作用。本研究初步证实 LBP 能够改善小鼠过敏性哮喘, 并且显著改变了肠道菌群的组成, 为该病的防治提供了新的手段与策略, 丰富了该病的发病机制。然而, LBP 改善哮喘的具体机制以及与肠道菌群的关联需要在接下来的研究中进一步展开研究。

参考文献

- [1] Pinnock H, Parke H L, Panagioti M, et al. Systematic meta-review of supported self-management for asthma: A healthcare perspective [J]. *Bmc Medicine*, 2017, 15(1): 64
- [2] Reddel H K, Bateman E D, Becker A, et al. A summary of the new GINA strategy: A roadmap to asthma control [J]. *European Respiratory Journal*, 2015, 46(3): 622-639
- [3] Ji N F, Xie Y C, Zhang M S, et al. Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model [J]. *International Immunopharmacology*, 2014, 21(1): 76-81
- [4] Fei H, Jia-Ning Y, Hong-Bo W, et al. Association of imbalance of effector T cells and regulatory cells with the severity of asthma and allergic rhinitis in children [J]. *Allergy and Asthma Proceedings*, 2017, 38(6): 70-77
- [5] Harper R W, Zeki A A. Immunobiology of the critical asthma syndrome [J]. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 2015, 48(1): 54-65
- [6] Kang Y, Cai Y. Gut microbiota and depression: From pathogenesis to new therapeutic strategies [J]. *Reviews in Medical Microbiology*, 2017, 28(2): 1
- [7] Fujimura K, Lynch S. Microbiota in allergy and asthma and the emerging relationship with the gut microbiome [J]. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(5): 592-602
- [8] Kim D, Zeng M Y, Núñez, et al. The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2017, 49(5): e339
- [9] Moussu H, Van OL, Horiot S, et al. *Bifidobacterium bifidum* NCC 453 promotes tolerance induction in murine models of sublingual immunotherapy [J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2012, 158(1): 35-42
- [10] Salamon P, Shefler I, Moshkovits I, et al. IL-33 and IgE stimulate mast cell production of IL-2 and regulatory T cells expansion in allergic dermatitis [J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2017, 47(11): 1409-1416
- [11] 朱彩平, 张声华. 枸杞多糖对高脂血症小鼠血脂及脂质过氧化的影响[J]. *营养学报*, 2005, 27(1): 79-80
- [12] ZHU Cai-ping, ZHANG Sheng-hua. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on blood lipid and lipid peroxidation in hyperlipidemia mice [J]. *ACTA Nutrimenta SINICA*, 2005, 27(1): 79-80
- [13] 王玲, 张才军, 李维波. 枸杞多糖-D 对四氧嘧啶糖尿病小鼠高血糖的防治作用[J]. *河北中医*, 2000, 22(2): 159-160
- [14] WANG Ling, ZHANG Cai-jun, LI Wei-bo. Preventive and therapeutic effects of *Lycium barbarum* polysaccharide-D on hyperglycemia in alloxan-induced diabetic mice [J]. *Hebei Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2000, 22(2): 159-160
- [15] 甘璐, 张声华. 枸杞多糖的抗肿瘤活性和对免疫功能的影响[J]. *营养学报*, 2003, 25(2): 200-202
- [16] GAN Lu, ZHANG Sheng-hua. Anti-tumor activity and immune function of *Lycium barbarum* polysaccharide [J]. *ACTA Nutrimenta SINICA*, 2003, 25(2): 200-202
- [17] Masci A, Carradori S, Casadei M A, et al. *Lycium barbarum*, polysaccharides: extraction, purification, structural characterisation and evidence about hypoglycaemic and hypolipidaemic effects: A review [J]. *Food Chemistry*, 2018: S0308814618301973
- [18] Varoni M V, Pasciu V, Gadau S D, et al. Possible antioxidant effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on hepatic cadmium-induced oxidative stress in rats [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 24(3): 2946-2955
- [19] Zhou F, Jiang X, Wang T, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP): A novel prebiotics candidate for *bifidobacterium* and *lactobacillus* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1034
- [20] Sabat A J, Zanten E, Akkerboom V, et al. Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification-increased discrimination of closely related species [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3434
- [21] Schwartz K, Sherlock G. High-throughput yeast strain sequencing [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(10): 833-836
- [22] Madhavan A, Sindhu R, Parameswaran B, et al. Metagenome analysis: a powerful tool for enzyme bioprospecting [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 183(2): 636-651
- [23] Haas, Brian J, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in sanger and 454-pyrosequenced PCR

- amplicons [J]. Genome Research 2011,21 (3): 494-504
- [21] Li, Bing, et al. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis [J]. Water Research, 2013, 47 (13): 4207-4216
- [22] Kim B R, Shin J, Guevarra R . Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities [J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 27(12): 2089
- [23] Chua L L, Rajasuriar R , Azanan M S , et al. Reduced microbial diversity in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia and microbial associations with increased immune activation [J]. Microbiome, 2017, 5(1): 35
- [24] Lozupone C A, Hamady M, Kelley S T, et al. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2007, 73(5): 1576-85
- [25] 陈谱,何韶衡.支气管哮喘的病理学研究进展[J].中华儿科杂志,2005,43(3):235-238
- CHEN Pu, HE Shao-heng. Advances in pathology of bronchial asthma [J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2005, 43(3): 235-238
- [26] 黄煌,郑鹏远.食物过敏对小鼠肠道屏障功能及 CD4+CD25+调节性 T 细胞的影响[J].世界华人消化杂志,2008, 16(17):1932-1937
- HUANG Huang, ZHENG Peng-Yuan. Effects of food allergy on intestinal barrier function and CD4+CD25+regulatory T cells in mice [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2008, 16(17): 1932-1937
- [27] 譙仕彦,侯成立,曾祥芳.乳酸菌对猪肠道屏障功能的调节作用及其机制[J].动物营养学报,2014,26(10):3052-3063
- QIAO Shi-yan, HOU Cheng-li, ZENG Xiang-fang. Regulation and mechanism of lactic acid bacteria on porcine intestinal barrier function [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(10): 3052-3063
- [28] Maynard C L, Elson C O, Hatton R D, et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system [J]. Nature, 2012, 489(7415): 231-241
- [29] Guilloteau P, Martin L, Eeckhaut V, et al. From the gut to the peripheral tissues: The multiple effects of butyrate [J]. Nutrition Research Reviews, 2010, 23(2): 366-384
- [30] 赵丹莉,谢明杰.高通量测序技术分析壳寡糖对小鼠肠道菌群的影响[J].营养学报,2018,40(5):449-453
- ZHAO Dan-li, XIE Ming-jie. High throughput sequencing analysis of chitosan oligosaccharides on intestinal flora in mice [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2018, 40(5): 449-453
- [31] Stiemsma L T , Arrieta M C, Dimitriu P A , et al. Shifts in lachnospira and *Clostridium* sp. in the 3-month stool microbiome are associated with preschool-age asthma [J]. Clinical Science, 2016, 130(23): 2199
- [32] Muriel Derrien, Clara Belzer, Willem M. de Vos. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 106: 171-181

(上接第 197 页)

- [24] Tsai S Y, Tsai H L, Mau J L. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis* [J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(8): 1392-1402
- [25] 周丹.栓皮栎提取物对食源性致病菌的抑菌作用及其机理初步研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2016
- ZHOU Dan. Research on antibacterial activity and mechanism of extracts from *Quercus Variabilis* blume against foodborne pathogens [D]. Xian Yang: Northwest Agriculture and Forestry University, 2016
- [26] Piccirillo C, Demiray S, Ferreira A C S, et al. Chemical composition and antibacterial properties of stem and leaf extracts from Ginja cherry plant [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 43(1): 562-569
- [27] 肖新生,林倩英.枇杷叶提取物抑菌作用研究[J].现代食品科技,2010,26(1):59-62
- XIAO Xin-sheng, LIN Qian-ying. Bacteriostatic effects of loquat leaf extract [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(1): 59-62
- [28] 张叔良,易大年,吴天明.红外光谱分析与新技术[M].北京:中国医药科技出版社,1993,76-116
- ZHANG Shu-liang, YI Da-nian, WU Tian-ming. Infrared Spectrum Analysis and New Technologies [M]. Beijing: China Medical Science Press, 1993, 76-116