



粪肠球菌 MG 2108 对小鼠结肠炎症的缓解作用及机制研究

谢玫瑰, 王文艳, 罗灿, 刘玉洁, 兰时乐, 王征*

湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128

谢玫瑰, 王文艳, 罗灿, 刘玉洁, 兰时乐, 王征. 粪肠球菌 MG 2108 对小鼠结肠炎症的缓解作用及机制研究. 微生物学报, 2022, 62(12): 5056–5076.

Xie Meigui, Wang Wenyan, Luo Can, Liu Yujie, Lan Shile, Wang Zheng. Mechanism of *Enterococcus faecalis* MG 2108 against mouse colitis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 5056–5076.

摘要:【目的】为了筛选能抑制鼠类柠檬酸杆菌(*Citrobacter rodentium*)诱发的小鼠结肠炎的益生菌, 并研究其干预机制。【方法】对 4 株筛选的菌株进行人工模拟胃肠液耐受试验, 并体外测试它们对鼠类柠檬酸杆菌的抑制能力, 最终筛选出粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) MG 2108。72 只雄性 7 周龄 ICR 小鼠经过适应性饲养 7 d 后, 被随机分为 2 组: 正常对照组(MC 组, 24 只, 生理盐水)和炎症对照组(IC 组, 48 只, 1×10^{10} CFU/mL 灌胃鼠类柠檬酸杆菌), 7 d 后各采 12 只小鼠, 通过结肠组织 HE 染色和炎症因子检测实验, 判断炎症模型建成。原 MC 组(剩下 12 只小鼠)更名为 NC 组, 用以区别建模前后的正常对照组, IC 组随机分成 3 组: 自然恢复组(IR 组, 12 只, 生理盐水)、环丙沙星组(CF 组, 12 只, 4 mg/mL 环丙沙星)和粪肠球菌 MG 2108 组(EF 组, 12 只, 1×10^8 CFU/mL 粪肠球菌 MG 2108)。18 d 后结束灌胃, 所有小鼠麻醉后眼球取血, 解剖。【结果】粪肠球菌 MG 2108 可以缓解和修复鼠类柠檬酸杆菌引发的小鼠结肠和肝脏损伤, 并且通过降低炎症细胞因子的表达水平和增加紧密连接蛋白的表达水平, 促进了结肠炎症组织的修复。它改变了肠道微生物菌群结构, EF 组的肠杆菌属(*Enterorhabdus*)和阿克曼菌属(*Akkermansia*)等有益菌群的丰度增加, 同时短链脂肪酸也显著增加($P < 0.05$), 并且优于 CF 组和 IR 组。【结论】粪肠球菌 MG

基金项目: 长沙市自然科学基金(kq2202218); 湖南省技术创新引导计划(S2020GXXKJGG0272); 湖南创新型省份建设专项(2020NK2029)

Supported by the Natural Science Foundation of Changsha (kq2202218), by the Science and Technology Innovation Program of Hunan Province (S2020GXXKJGG0272) and by the Special Project for the Construction of Innovative Provinces in Hunan Province (2020NK2029)

*Corresponding author. E-mail: wz8918@163.com; zhengw@hunau.edu.cn

Received: 9 April 2022; Revised: 11 July 2022; Published online: 22 July 2022

2108 是一株有利于肠道健康的益生菌, 治疗鼠类柠檬酸杆菌诱导的小鼠结肠炎效果优于环丙沙星, 自然恢复组效果明显差于 EF 组。

关键词: 粪肠球菌 MG 2108; 肠道菌群; 短链脂肪酸; 结肠炎症

Mechanism of *Enterococcus faecalis* MG 2108 against mouse colitis

XIE Meigui, WANG Wenyan, LUO Can, LIU Yujie, LAN Shile, WANG Zheng*

College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: [Objective] To screen probiotics with inhibitory effect on murine colitis induced by *Citrobacter rodentium* and to investigate the mechanism. [Methods] The tolerance of the four screened strains was tested with simulated gastrointestinal fluid, and their inhibitory ability against *C. rodentium* was examined *in vitro*. Finally, *Enterococcus faecalis* MG 2108 was screened out. A total of 72 male 7-week-old ICR mice were randomized into two groups after 7-day adaptive feeding: normal control group (MC, 24 mice, normal saline) and inflammation control group (IC, 48 mice, 1×10^{10} CFU/mL *C. rodentium*). After 7 days, 12 mice were respectively selected from the two groups and the inflammation was examined based on hematoxylin and eosin (HE) staining of colonic tissues and detection of inflammatory factors. The remaining 12 mice from the MC were renamed as NC to distinguish the normal control group before and after modeling. The mice of IC group were randomly divided into three groups: natural recovery group (IR, 12 mice, normal saline), ciprofloxacin group (CF, 12 mice, 4 mg/mL ciprofloxacin), and *E. faecalis* MG 2108 group (EF, 12 mice, 1×10^8 CFU/mL *E. faecalis* MG 2108). After 18 days of gavage, all mice were anesthetized and dissected and blood was taken from the eyes. [Results] *E. faecalis* MG 2108 alleviated the injury of colon and liver induced by *C. rodentium*. *E. faecalis* MG 2108 promoted the repair of colon tissue via decreasing the expression of inflammatory cytokines and increasing the expression of tight junction protein. *E. faecalis* MG 2108 induced structural changes in gut microbiota, as the abundance of beneficial flora such as *Enterorhabdus* and *Akkermansia* increased in EF group, and the content of short-chain fatty acids (SCFAs) in EF group was higher than that in CF and IR groups ($P < 0.05$). [Conclusion] *E. faecalis* MG 2108, an intestinal probiotic strain, shows better effect on the *C. rodentium*-induced colitis than ciprofloxacin, and the effect of IR group was significantly inferior to that of EF group.

Keywords: *Enterococcus faecalis* MG 2108; intestinal flora; short-chain fatty acids; colonic inflammation

肠道炎症是由细菌、病毒、真菌和寄生虫等引起的肠炎^[1]。抗生素普遍被用于治疗肠道炎症, 在维护人类和动物健康方面发挥着极其重要的作用^[2]。然而, 抗生素的大量使用导致了细菌抗性基因的增加、生物体内药物残留超

标及环境污染等严重的安全问题^[3], 因此, 寻找抗生素替代物或减少抗生素的使用已成为普遍共识。随着人们对益生菌、益生元和合生元作用的研究和认知的深入, 越来越多的益生菌被开发和利用^[4-5]。很多益生菌属于乳酸菌^[6], 它们

在保护宿主免受有害微生物侵害、增强宿主免疫力及减少代谢紊乱等方面发挥着重要作用^[7]。

有研究表明,很多乳酸菌能调节机体胃肠道正常菌群、保持微生态平衡,抑制肠道内腐败菌生长繁殖和腐败物质的产生^[8-9]。粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)是一种兼性厌氧肠球菌属的乳酸菌,呈革兰氏阳性,是哺乳动物肠道菌群的一员,具有免疫调节作用^[10]。粪肠球菌能够产生抗菌物质,抑制有害菌金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长^[11]。饲料中添加粪肠球菌不仅可以增强仔猪的机体免疫性能,还可以改善断奶前仔猪腹泻^[12]。已有研究表明,高温灭活的粪肠球菌 2001 对炎症性肠病模型的小鼠具有保护作用,通过其治疗后可降低炎症结肠组织中环氧合酶-2 (COX-2)、诱导性一氧化氮合成酶(iNOS)、干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-1 β (IL-1 β)和白介素-6 (IL-6)细胞因子的表达^[13]。

目前,粪肠球菌广泛运用于药品和食品领域^[14-15]。但有关粪肠球菌能否替代抗生素治疗机体结肠炎症的研究甚少。本研究利用鼠类柠檬酸杆菌喂养小鼠,一周后成功构建小鼠结肠炎症模型。在此基础上,将炎症小鼠分为3组,分别为自然恢复组(IR组)、炎症模型组(CF组)和粪肠球菌组(EF组),以探求分别在无干预自然恢复、环丙沙星治疗以及粪肠球菌 MG 2108 治疗下,小鼠的结肠炎症能否得到缓减。通过测定小鼠的各项生理生化指标,分析肠道菌群结构,比较和阐述上述3种处理方法对鼠类柠檬酸杆菌引起的小鼠结肠炎症的影响,并揭示其作用机制。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

试验所用菌株由实验室前期分离鉴定所得。分别为粪肠球菌 MG 2108 (*Enterococcus*

faecalis, X1)、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentans*, X2)、德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*, X3)、嗜酸小球菌 (*Pediococcus acidophilus*, X4)和鼠类柠檬酸杆菌(*Citrobacter rodentium*, M1)。

1.2 耐受性试验

预先配制人工模拟胃肠液备用,制备 X1、X2、X3 和 X4 四株菌的菌悬液。耐酸能力测定:取 4.8 mL 培养了 24 h 的菌悬液置于 20 mL 人工模拟胃液中,摇匀,于 37 °C、90 r/min 培养,取 0、1.5 和 3 h 的培养液稀释涂板计数。耐碱能力测定:取配好的肠液 80 mL 置于上述已经模拟消化了 3 h 的胃液中,摇匀,于 37 °C、90 r/min 培养,取 0、3、6 h 的培养液稀释涂板计数。

1.3 试验设计

72 只 7 周龄的雄性 ICR 小鼠[SCXK (湘) 2019-0004]购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,普通饲料[SCXK (湘) 2015-0010]购自湖南嘉泰实验动物有限公司。试验过程中涉及小鼠的各项操作,均严格遵守湖南省《实验动物管理条例》^[16]进行。各组小鼠饲养温度(22 \pm 1) °C,12 h 明/12 h 暗循环,全光谱日光灯,每天均喂食相同的普通饲料,自由饮水。经过 7 d 的适应性饲养后随机分为 2 组:正常对照组(MC组) 24 只和炎症对照组(IC组) 48 只。MC组灌胃生理盐水,IC组灌胃鼠类柠檬酸杆菌 1 mL/只/天(1×10^{10} CFU/mL),7 d 之后,从 MC 和 IC 组分别采取 12 小鼠只的结肠组织进行 HE 染色。原 MC 组(保留了 12 只小鼠)更名为自然对照组(NC组),IC 组随机分为 3 组,分别为自然恢复组(IR组)、环丙沙星组(CF组)和粪肠球菌 MG 2108 组(EF组)。其中 NC 组和 IR 组每天灌胃生理盐水 1 mL/只、CF 组每天灌胃环丙沙星溶液 1 mL/只(4 mg/mL)和 EF 组每天灌胃粪肠球菌 MG 2108 1 mL/只(1×10^8 CFU/mL)。

18 d后结束灌胃, 解剖小鼠, 取出相应组织和器官称重, 锡箔纸包裹组织, 置于液氮速冻并转至 -80°C 冰箱保存。实验时间计划示意图如图1所示。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 小鼠结肠组织形态学-HE染色

将固定好的结肠组织放于自来水下缓慢冲洗2 h, 去掉固定液。将组织块进行脱水-包埋-切片-苏木素染色-伊红染色-中性树胶封片。

1.4.2 ELISA血清炎症因子测定

根据联科生物酶联免疫试剂盒说明书操作^[17]。

1.4.3 肝脏抗氧化指标检测

根据南京建成生物 T-SOD、POD 和 MDA 试剂盒说明书操作^[18]。

1.4.4 实时荧光定量PCR测定

根据试剂盒提取结肠组织中的总RNA, 采用FastKing RT Kit With gDNase试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)去除gDNA, SuperReal PreMix Plus SYBR Green试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)进行反转录, 7300 Real-Time PCR仪(ABI公司)收集小鼠结肠组织各样品的反应Ct值, 进行mRNA相对表达量计算。

1.4.5 Western blotting测定

将制备好的样品置于 -80°C 保存。选择12%浓度的下层分离胶和5%浓度的上层浓缩胶进行电泳, 180 mA转膜75 min, 封闭2 h, 一抗抗体过夜, 孵二抗2 h。发光显色液进行显

色, 用Image J对结果进行灰度分析。

1.4.6 GC-MS测定SCFAs含量^[19]

将小鼠粪便置于旋涡混匀器上剧烈震荡混匀, 离心取上清液于EP管中, 加入25%偏磷酸, 室温静置反应4 h, 离心后得到的上清液用 $0.45\ \mu\text{m}$ 一次性水系滤膜过滤, 置于气相进样瓶中进行测定。根据标准曲线, 算出小鼠各类短链脂肪酸含量。

1.4.7 肠道微生物测定

以干冰运输小鼠粪便至上海百趣生物医学科技有限公司(上海)进行肠道微生物检测。提取小鼠粪便肠道微生物的总DNA。进行小鼠粪便样本的目标片段PCR扩增, 将PCR扩增产物通过2%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并对目标片段进行切胶回收(AXYGEN公司的凝胶回收试剂盒)。第一轮引物的组成: PacBio Universal序列+16S/ITS/古菌引物, 目的在于特异性的扩增; 第二轮引物的组成: Barcode序列+PacBio Universal, 目的是给每个样本加上barcode。将PCR扩增回收产物进行荧光定量, 荧光试剂为Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit, 定量仪器为Microplate reader (BioTek, FLx800)。采用PacBio公司的Template Prep Kit 1.0试剂制备测序文库。

1.5 统计学分析

利用SPSS 25.0软件进行统计学分析, 使用单因素ANOVA法对不同组间差异性进行显

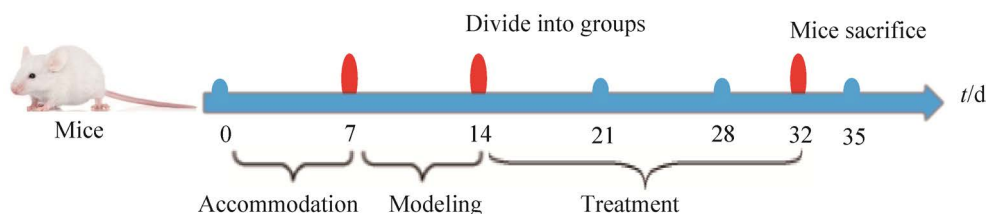


图1 实验时间计划示意图

Figure 1 Diagram of experimental time plan.

著性分析以及双相关性进行不同组间相关性分析, 事后比较选择 LSD、邓肯(D), 数据以“mean±SEM”作图, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。用 GrapPad Prism 8 进行结果分析及作图。

2 结果与分析

2.1 四株乳酸菌对人工模拟胃肠液的体外耐受性实验

X1、X2、X3 和 X4 4 株菌均以 1×10^{10} CFU/mL 浓度加入到人工模拟胃肠液中。如表 1 所示, 0 h 以及经过 1.5 h 的人工模拟胃液处理后, 除了 X3, 其他菌的存活率均有所降低; 但是经过

3 h 处理后, X4 的存活率有所升高。如表 2 所示, 4 株乳酸菌经过胃液“消化了”3 h 后, 再转入人工模拟肠液 3 h 后, X1、X2、X3 和 X4 的存活率处于较高水平, 直到经过 6 h 人工模拟肠液处理后, 4 株菌的存活率有了非常明显的降低。相比之下, X1 和 X3 的人工胃肠液耐受力较强。

2.2 四株菌和抗生素对鼠类柠檬酸杆菌的抑菌实验

由表 3 所知, X1 和 X3 的抑菌直径分别为 (6.8±0.08) mm 和 (7.3±0.14) mm, 结合表 1 和表 2 中 4 株菌耐受人工模拟胃肠液的结果, 我们

表 1 乳酸菌对胃液的耐受性测定

Table 1 Determination of tolerance of lactic acid bacteria to gastric fluids

Strain	Initial colony count/ (10^9 CFU/mL)	1.5 h		3 h	
		Number of active bacteria/ (10^9 CFU/mL)	Survival rate/ %	Number of active bacteria/ (10^9 CFU/mL)	Survival rate/ %
X1	2.25±0.31	1.22±0.12	54.22±0.39	0.50±0.029	22.22±0.41
X2	2.07±0.22	0.73±0.04	35.26±0.18	0.70±0.06	33.81±0.96
X3	0.28±0.02	0.32±0.02	114.28±1.00	0.15±0.01	53.57±0.50
X4	1.11±0.20	0.29±0.03	26.13±0.15	0.50±0.03	45.05±1.00

表 2 乳酸菌对肠液的耐受性测定

Table 2 Determination of the tolerance of lactic acid bacteria to intestinal fluids

Strain	Initial colony count/ (10^6 CFU/mL)	3 h		6 h	
		Number of active bacteria/ (10^6 CFU/mL)	Survival rate/ %	Number of active bacteria/ (10^6 CFU/mL)	Survival rate/ %
X1	0.93±0.07	5.14±0.32	552.69±4.57	0.43±0.06	46.23±0.19
X2	0.63±0.02	2.44±0.40	387.31±20.00	0.14±0.03	22.22±0.08
X3	0.08±0.01	0.31±0.09	387.50±9.00	0.03±0.01	37.50±0.11
X4	0.34±0.27	0.31±0.09	91.18±0.33	0.02±0.01	5.88±0.11

表 3 乳酸菌对鼠类柠檬酸杆菌的抑菌实验

Table 3 Bacteriostasis of lactic acid bacteria against *Citrobacter rodentium*

Strain	Inhibition diameter/mm		Sensitivity level
	Bacterial solution/(1×10^8 CFU/mL)	Saline/(9 mg/mL)	
X1	6.8±0.08	0±0.00	Not sensitive
X2	6.3±0.12	0±0.00	Not sensitive
X3	7.3±0.14	0±0.00	Lowly sensitive
X4	4.0±0.06	0±0.00	Not sensitive

认为 X1 的抑菌能力和稳定性均较好, 所以最终选择了 X1 即粪肠球菌 MG 2108 进行后续的小鼠实验。由表 4 和 5 所知, 无论是相同剂量的 4 种抗生素还是不同剂量的 4 种抗生素, 对鼠类柠檬酸杆菌抑菌效果相似, 其中鼠类柠檬酸杆菌对土霉素和环丙沙星均为极度敏感, 考虑环丙沙星抑菌效果更好, 最终选择环丙沙星作为后续治疗小鼠结肠炎的抗生素。

2.3 粪肠球菌 MG 2108 药敏试验

由表 6 可知, 粪肠球菌 MG 2108 对多种抗生素敏感, 提示其携带较少耐药基因, 传播耐药基因的风险较低。

2.4 小鼠体重、饮食量

由图 2A、2C 和 2E 可知, 建模期间小鼠初始体重为(33.28±0.52) g, 经鼠类柠檬酸杆菌灌胃 7 d 后, 体重有所上升, 但组间无显著性差

异($P>0.05$)。建模期间的小鼠食量呈下降趋势, 说明鼠类柠檬酸杆菌引起小鼠食欲下降。由图 2B、2D 和 2F 可知, 治疗期间抗生素组体重略有下降, 但同时段内各组小鼠体重、食量及饮水量均无显著性差别($P>0.05$)。

2.5 小鼠器官重量

表 7 结果表明, 灌胃鼠类柠檬酸杆菌 7 d 后, 对小鼠的结肠、心脏、肝脏、脾、肾和脑重量均无显著性的影响($P>0.05$)。如表 8 所示, 经过治疗后和 NC 组相比, IR 组和 CF 组的脾脏重量显著下降($P<0.05$), 除此之外, 各组小鼠的器官重量几乎没有差别。综上所述, 说明鼠类柠檬酸杆菌影响了小鼠的免疫力, 在自然恢复和环丙沙星治疗下, 脾脏指数没有恢复, 但灌胃粪肠球菌 MG 2108 组脾脏指数与对照组无显著差别($P>0.05$)。

表 4 相同剂量抗生素对鼠类柠檬酸杆菌的抑菌实验

Table 4 Bacteriostasis of the same dose of antibiotics against *Citrobacter rodentium*

Antibiotic types	Inhibition diameter/mm		Sensitivity level
	Aqueous solution/(1.33 mg/mL)	Saline/(9 mg/mL)	
Oxytetracycline	22±0.10	0±0.00	Extremely sensitive
Ciprofloxacin	43±0.10	0±0.00	Extremely sensitive
Chlortetracycline	8.0±0.10	0±0.00	Lowly sensitive
Tetracycline	4.0±0.00	0±0.00	Not sensitive

表 5 不同剂量抗生素对鼠类柠檬酸杆菌的抑菌实验

Table 5 Bacteriostasis of different doses of antibiotics against *Citrobacter rodentium* with the unequal antibiotics

Type and content of antibiotics	Inhibition diameter/mm		Sensitivity level
	Aqueous solution	Saline/(9 mg/mL)	
Oxytetracycline (8 mg/mL)	27±0.25	0±0.00	Extremely sensitive
Ciprofloxacin (4 mg/mL)	43±0.25	0±0.00	Extremely sensitive
Chlortetracycline (1.33 mg/mL)	10±0.06	0±0.00	Moderately sensitive
Tetracycline (1.33 mg/mL)	4.0±0.15	0±0.00	Not sensitive

表 6 粪肠球菌 MG 2108 药敏试验抑菌圈直径

Table 6 The result of *Enterococcus faecalis* drug-sensitivity test

Antibiotic types	Inhibition diameter/mm	Sensitivity level	Types
Doxycycline (DOX)	30.67±1.15	Extremely sensitive	Tetracycline
Tetracycline (TET)	30.67±0.58	Extremely sensitive	Tetracycline
Minocycline (MIN)	25.67±0.58	Extremely sensitive	Tetracycline
Florfenicol (FFC)	28.33±0.58	Extremely sensitive	Chloramphenicol
Compound trimethoprim (T/S)	22.67±0.58	Extremely sensitive	Sulfonamides
Vancomycin (VA ₃₀)	20.33±1.15	Extremely sensitive	Glycopeptides
Gentamicin (ERM)	18.33±0.58	Highly sensitive	Aminoglycoside
Ciprofloxacin (CFX)	18.00±1.00	Highly sensitive	Quinolone
Levofloxacin (LVX)	15.67±1.15	Highly sensitive	Quinolone
Penicillin (PEN)	15.00±1.00	Highly sensitive	Penicillin
Piperacillin (PRL)	17.67±0.58	Highly sensitive	Penicillin
Cefoperazone (CPZ)	15.33±0.58	Highly sensitive	Cerosphere
Amikana (AZI)	13.67±0.58	Moderately sensitive	Aminoglycoside
Azithromycin (AMK)	13.00±1.00	Moderately sensitive	Macrolide
Norfloxacin (NFX)	13.33±0.58	Moderately sensitive	Quinolone
Ampicillin (AMP)	12.67±0.58	Moderately sensitive	Penicillin
Erythromycin (GEN)	6.33±1.53	Lowly sensitive	Macrolide
Lincomycin (LZN)	8.00±0.00	Lowly sensitive	Amide
Imipenem (IPM)	0.00±0.00	Not sensitive	Carbonia
Kanamycin (KAZ)	0.00±0.00	Not sensitive	Aminoglycoside
Streptomycin (STM)	0.00±0.00	Not sensitive	Aminoglycoside
Oxacillin (OXA)	0.00±0.00	Not sensitive	Penicillin
Cephalexin (CHA)	0.00±0.00	Not sensitive	Cerosphere
Cefazolin (CEZ)	0.00±0.00	Not sensitive	Cerosphere
Cefuroxime Sodium (CFO)	0.00±0.00	Not sensitive	Cerosphere
Ceftazidime (CTZ)	0.00±0.00	Not sensitive	Cerosphere
Ceftriaxone (CTR)	0.00±0.00	Not sensitive	Cerosphere
B Polymyxin B (POL)	0.00±0.00	Not sensitive	Polypeptide
Chloramphenicol (CHA)	0.00±0.00	Not sensitive	Other
Clindamycin (CEZ)	0.00±0.00	Not sensitive	Other

表 7 小鼠造模期间的器官重量

Table 7 Organ weights of mice during modeling/g

Organ	MC	IC
Colon	0.53±0.04 ^a	0.46±0.03 ^a
Heart	0.18±0.01 ^a	0.16±0.00 ^a
Liver	1.47±0.05 ^a	1.47±0.04 ^a
Spleen	0.11±0.01 ^a	0.11±0.01 ^a
Kidney	0.51±0.04 ^a	0.53±0.02 ^a
Brain	0.45±0.01 ^a	0.41±0.02 ^a

Not containing the same alphabet indicates a significant difference ($P<0.05$), containing one or more of the same alphabets indicates no significant difference. Same as below.

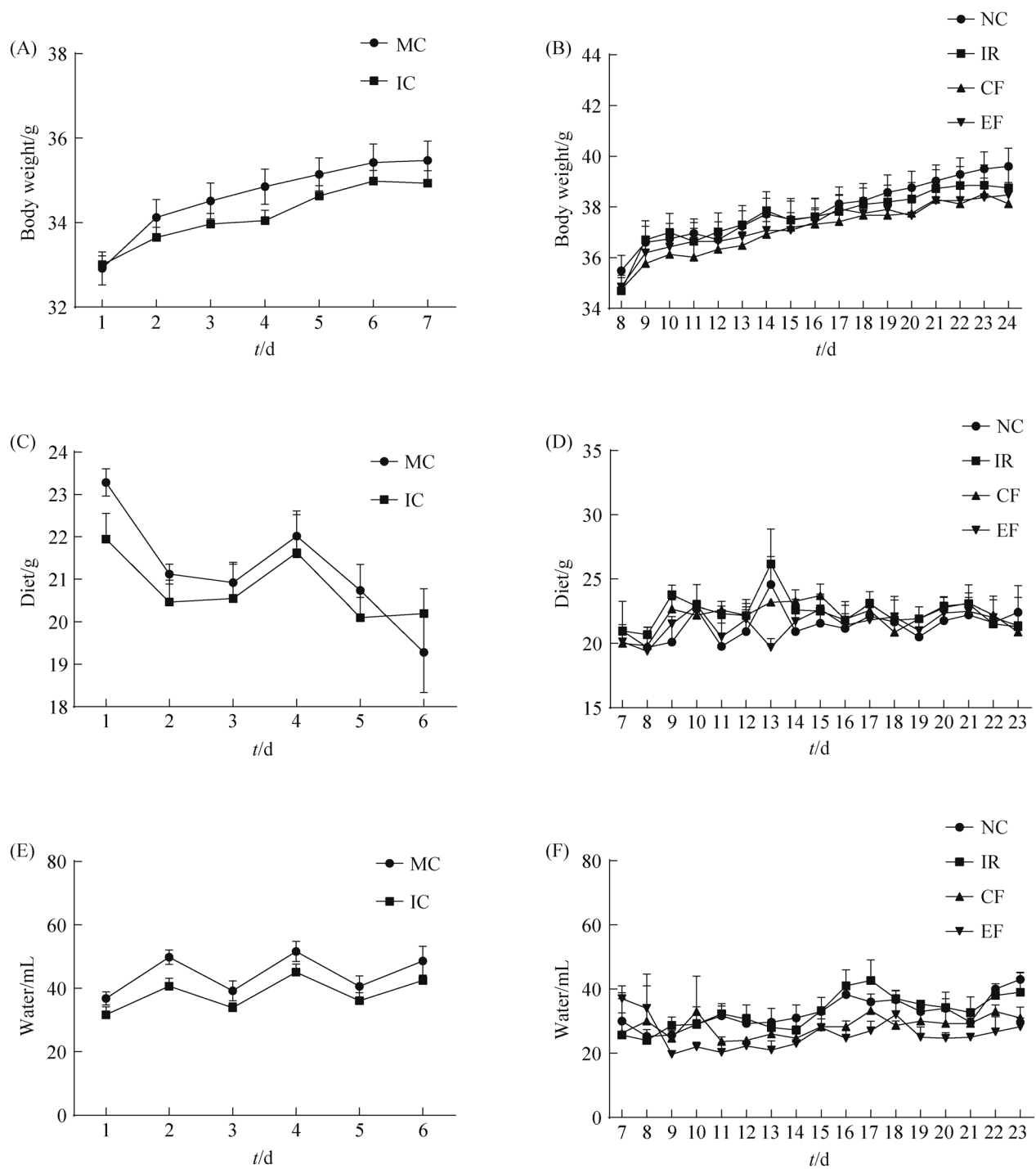


图 2 小鼠体重、食量和饮水量变化

Figure 2 Changes in body weight, diet and water intake of mice. A, B: body weight change during modeling and treatment; C, D: diet change during modeling and treatment; E, F: water change during modeling and treatment. MC: blank control group; IC: inflammation group; NC: natural control group; IR: natural recovery group; CF: ciprofloxacin group; EF: *Enterococcus faecalis* group. Graphing with “mean±SEM”. Same as below.

表 8 小鼠治疗期间的器官重量

Table 8 Organ weights of mice during treatment/g

Organ	NC	IR	CF	EF
Colon	0.55±0.04 ^a	0.49±0.09 ^a	0.49±0.04 ^a	0.59±0.05 ^a
Heart	0.20±0.02 ^a	0.19±0.01 ^a	0.20±0.01 ^a	0.19±0.01 ^a
Liver	1.71±0.06 ^a	1.61±0.04 ^a	1.65±0.03 ^a	1.57±0.04 ^a
Spleen	0.14±0.02 ^a	0.10±0.01 ^b	0.10±0.00 ^b	0.11±0.01 ^{ab}
Kidney	0.59±0.03 ^a	0.60±0.01 ^a	0.61±0.02 ^a	0.62±0.03 ^a
Brain	0.42±0.02 ^a	0.43±0.02 ^a	0.44±0.01 ^a	0.43±0.01 ^a

2.6 结肠组织 HE 染色

由图 3A 可以看出, 与 MC 组比较, IC 组小鼠的结肠长度显著缩短($P<0.05$); 与 NC 组相比, IR 组($P<0.05$)和 CF 组($P<0.01$)小鼠的结肠长度均显著缩短, EF 组则有所增长; 结肠的长度和炎症有一定的关联, 结肠越短说明炎症越严重。如图 3B 所示, HE 染色切片结果也验证

了这一点, IC 组小鼠结肠切片发生了几处明显的炎症聚集, 肠上皮组织受损且出现水肿, 隐窝结构排列紊乱。而 EF 组结肠切片与正常对照组的几乎无差别。因此, 在灌胃鼠类柠檬酸杆菌引发的小鼠结肠组织炎症现象中, 通过粪肠球菌 MG 2108 的干预能明显改善小鼠的结肠形态学上的损伤, 且效果优于 CF 组和 IR 组。

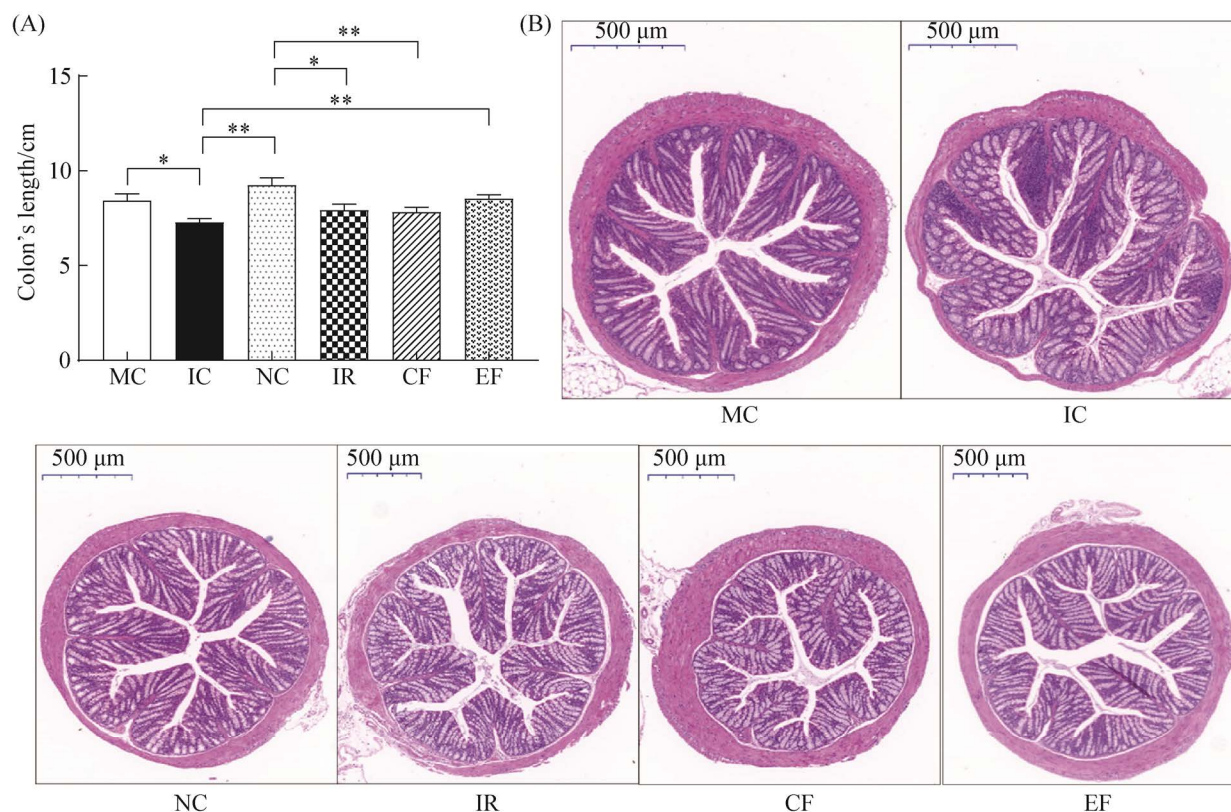


图 3 各组小鼠的结肠长度和 HE 染色切片结果

Figure 3 Colonic length and HE-stained sections of the mice in each group. A: colonic length in mice; B: HE-stained sections of mouse colon. ** $P<0.01$, * $P<0.05$. Same as below. Scale bar: 500 μm.

2.7 ELISA 血清炎症因子测定

为进一步确定各组小鼠结肠炎症情况, 我们利用 ELISA 测定了各组小鼠血清中重要炎症指标肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量。由图 4 可知, 与 MC 组相比较, IC 组的 TNF- α 的含量显著升高($P<0.05$), 增加了 40.39%。CF 组和 EF 组的 TNF- α 的含量显著低于 IC 组($P<0.05$), 分别减少了 17.89%和 23.29%。提示粪肠球菌干预和环丙沙星干预可以有效缓解灌胃鼠类柠檬酸

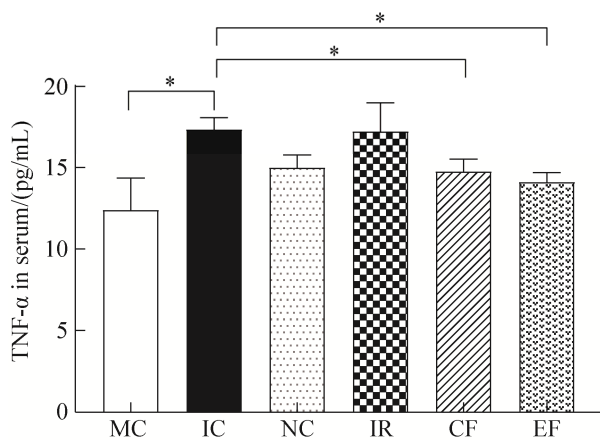


图 4 各组小鼠血清中促炎症因子 TNF- α 的含量变化

Figure 4 Changes in serum levels of the pro-inflammatory factor TNF- α in various groups of mice.

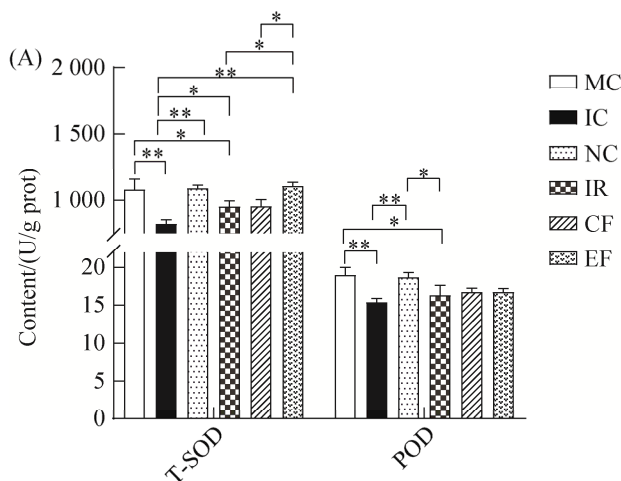


图 5 各组小鼠的肝脏抗氧化指标

Figure 5 Antioxidant indexes of liver in each group of mice.

杆菌所导致的小鼠结肠炎症反应, 但自然恢复组与炎症组无显著差别($P>0.05$)。

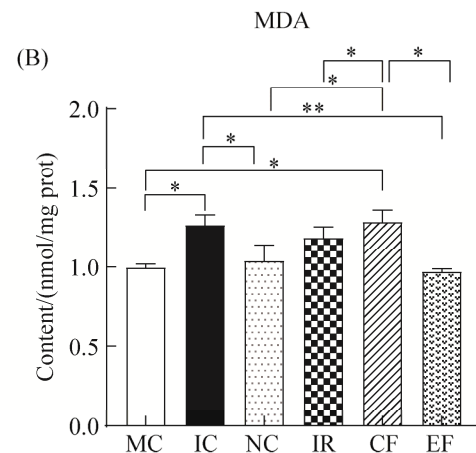
2.8 小鼠肝脏抗氧化指标

如图 5 所示, 灌胃鼠类柠檬酸杆菌后, 相较 MC 组或 NC 组, IC 组小鼠肝脏的总超氧化物歧化酶(T-SOD)和过氧化物酶(POD)的含量显著降低($P<0.05$), 分别减少了 31.16%和 23.73%; 丙二醛(MDA)的含量显著升高($P<0.05$), 增加了 27.34%。经过一段时间治疗后, 与 CF 组和 IR 组相比, EF 组小鼠肝脏的 T-SOD 的含量显著升高($P<0.05$), 分别增加了 15.80%和 16.14%, 且与 NC 组无区别。与 NC 组相比, IR 组中 POD 的含量显著降低($P<0.05$), 减少了 14.37%, 而 CF 组和 EF 组 POD 含量虽有所降低, 但无显著差别。EF 组 MDA 的含量显著低于 CF 组, 减少了 32.70%。由此推断, 粪肠球菌 MG 2108 的治疗可以抑制鼠类柠檬酸杆菌引发的小鼠肝脏抗氧化能力的降低, 保护小鼠肝脏组织的抗氧化能力。

2.9 实时荧光定量 PCR 检测小鼠结肠组织相关基因 mRNA 表达水平

2.9.1 促炎因子基因 mRNA 的表达

如图 6 所示, 与 MC 组相比, IC 组小鼠结



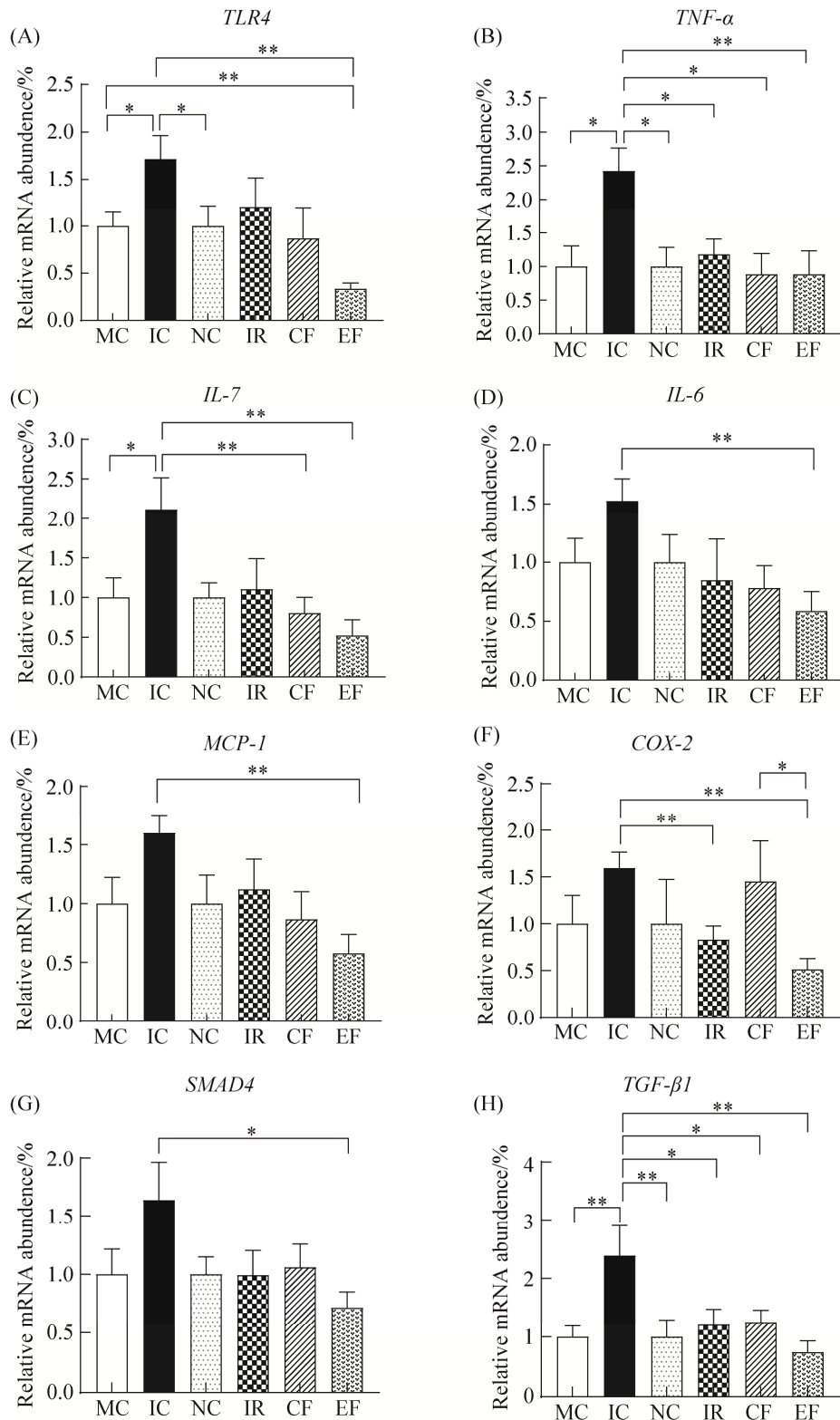


图 6 各组小鼠结肠组织中相关促进炎症基因的表达

Figure 6 Expression of relevant pro-inflammatory genes in colonic tissues of various groups of mice.

肠组织中的 *TLR4*、*TNF- α* 、*IL-7* 和 *TGF- β 1* 的 mRNA 相对表达量分别增加 142.33% ($P<0.05$)、71.57% ($P<0.05$)、111.8% ($P<0.05$)和 138.79% ($P<0.01$), 说明 IC 组炎症反应明显。与 IC 组比较, EF 组的环氧化酶-2 (*Cox-2*)的 mRNA 相对表达量减少 64.41% ($P<0.05$), 同时 EF 组 *TLR4*、*IL-7*、*TGF- β 1*、信号转导分子 4 (*SMAD4*)、单核细胞趋化蛋白 1 (*MCP-1*)和白介素-6 (*IL-6*)的 mRNA 相对表达量显著低于 CF 组 ($P<0.05$), 分别减少了 61.04%、34.95%、40.61%、32.55%、32.95%和 25.08%。由此说明, 灌胃粪肠球菌 MG 2108 能够显著降低促炎因子的 mRNA 相对表达水平, 从而缓解小鼠炎症, 并且效果优于自然恢复组和

环丙沙星组。

2.9.2 与肠上皮组织通透性相关基因和抑炎因子的 mRNA 表达水平

如图 7 所示, IC 组小鼠结肠闭锁小带蛋白-1 (*ZO-1*)、肠上皮紧密连接蛋白(*OCLN*)、转录因子-3 (*FOXP3*)和白介素-10 (*IL-10*)的 mRNA 相对表达量显著低于 MC 组 ($P<0.05$), 分别减少 53.81%、74.13%、80.94%和 72.65%; 与 IC 组相比, CF 组和 EF 组 *ZO-1*、*FOXP3* 和 *IL-10* 的 mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$); EF 组 *ZO-1* 的 mRNA 相对表达量相较 CF 组显著升高, 增加了 105.07%。

2.10 Western blotting 测定相关蛋白表达

如图 8 所示, 与 MC 组相比, IC 组的 *TNF- α* 、

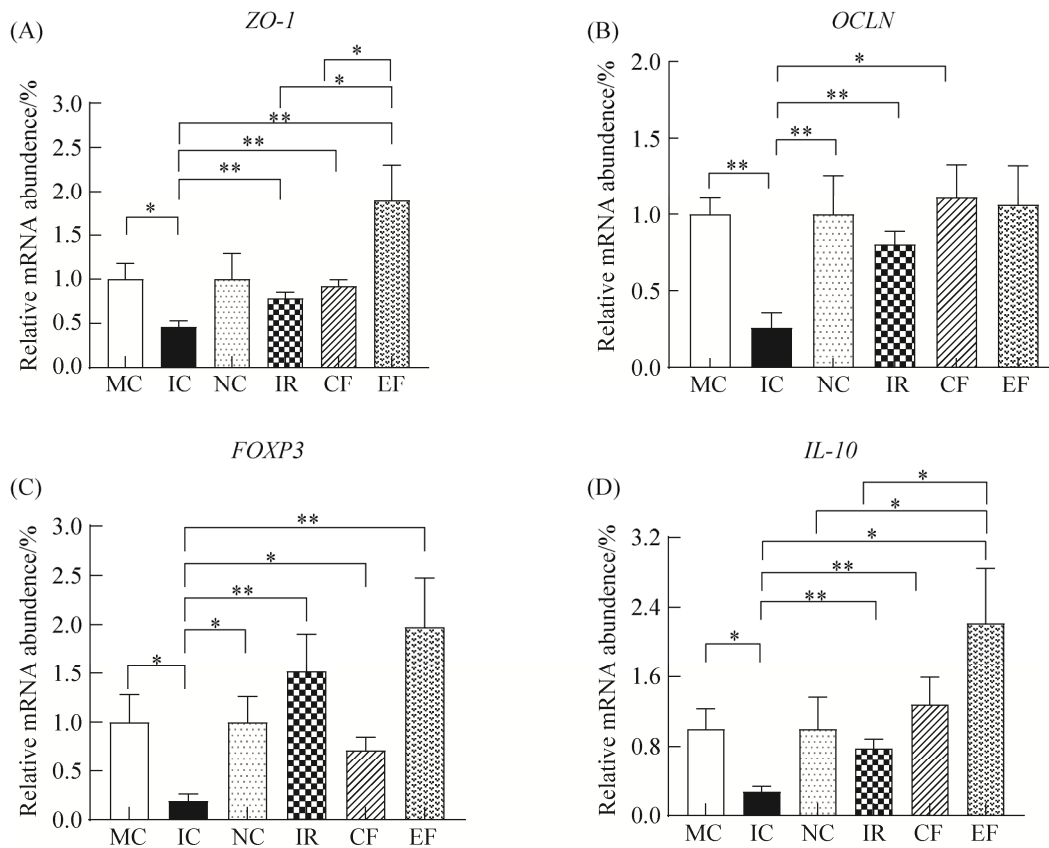


图 7 各组小鼠结肠组织中相关抑制炎症基因的表达

Figure 7 Expression of relevant inflammation-suppressing genes in the colonic tissues of mice in each group.

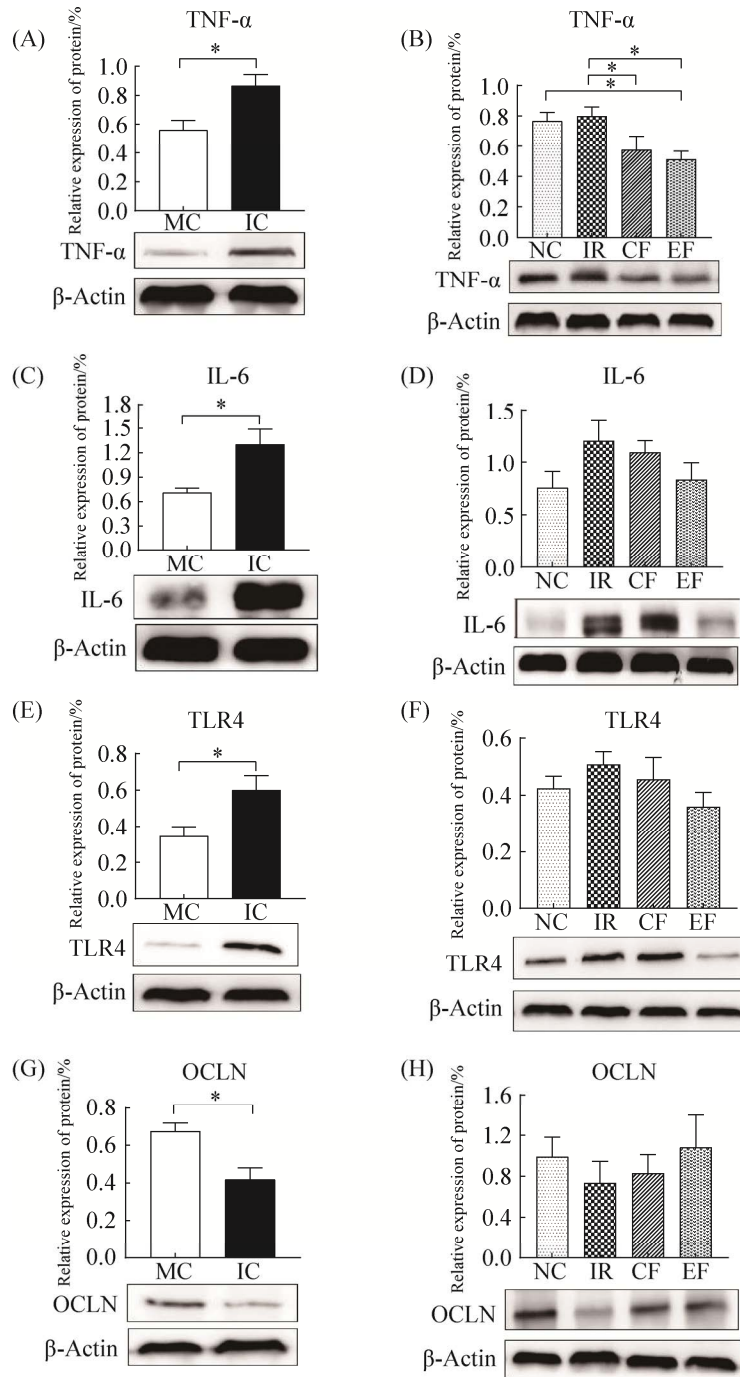


图 8 各组小鼠结肠组织中相关基因表达

Figure 8 Expression of related genes in the colon tissue of mice in different groups.

IL-6 和 TLR4 的蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.05$), 分别增加了 54.77%、83.76% 和 73.78%, 而 OCLN 的蛋白相对表达量显著降低

($P < 0.05$), 减少 61.25%。NC 组、IR 组、CF 组和 EF 组之间, 炎症标志分子 IL-6、TLR4 和连接蛋白 OCLN 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$)。

EF 组各指标最接近于 NC 正常组, 相比 IR 组和 CF 组, 炎症因子表达呈下降趋势, OCLN 的蛋白相对表达量有一定程度的升高。与 NC 组和 IR 组相比, EF 组 TNF- α 的蛋白质水平显著降低($P<0.05$), CF 组与之无显著差异。结果与 q-PCR 测定的 mRNA 结果相符。以上结果表明, 鼠类柠檬酸杆菌降低了小鼠肠上皮组织细胞间连接蛋白的表达水平, 可以推断灌胃鼠类柠檬酸杆菌增强了小鼠结肠的肠上皮细胞通透性, 从而加强了炎症反应。而灌胃粪肠球菌 MG 2108 可以抑制这个过程, 并且其效果优于环丙沙星治疗和自然恢复处理。

2.11 肠道微生物分析

2.11.1 肠道微生物多样性分析

为了进一步探究 3 种处理是否对小鼠微生物

肠道群落结构造成影响, 对各组小鼠结肠微生物多样性和组成进行了分析。如图 9 所示, 在 PCoA 主成分分析图中(图 9A), MC、IC、NC、IR、CF 和 EF 6 组间存在差异, 但组内没有显著性差异, 说明本实验分组情况良好; 在 ASV/OTU 的 Venn 图中(图 9B), 可以看出, MC、IC、NC、IR、CF 和 EF 6 组间有着相同的 OTU, 也有自己独特的 OTU, 6 组共有的 OTU 数量为 182, 各组独有的 OTU 数量分别为 31、71、24、31、36 和 47。

由表 9 可知, IC 组的 Chao 指数、observed species、Shannon、Simpson、Pielou-e 和 Faith-pd 比 MC 组均出现增加, 但是无显著差异($P>0.05$)。CF 组的 Chao 指数、observed species、Shannon、Pielou-e 和 Faith-pd 比 MC、IC、NC、IR 及 EF

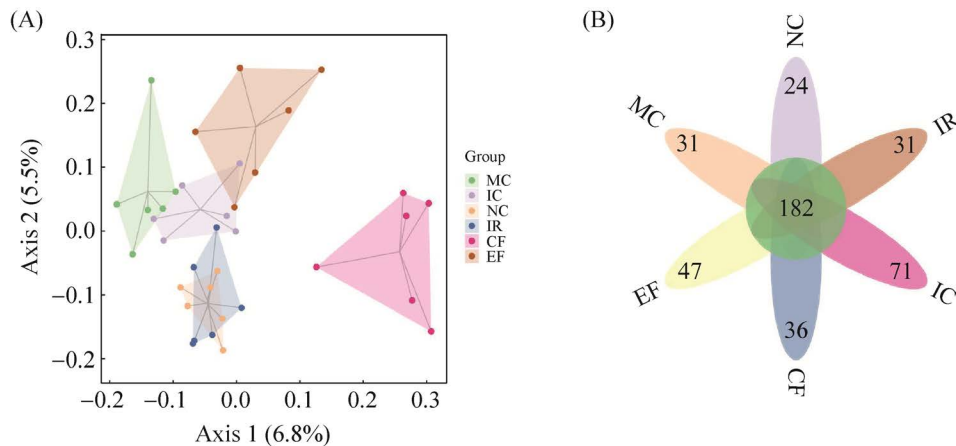


图 9 β 多样性分析

Figure 9 Beta diversity analysis. A: PCoA diagram; B: Venn diagram.

表 9 α 多样性分析

Table 9 Alpha diversity analysis

Parameter	MC	IC	NC	IR	CF	EF
Chao index	351.33±15.97 ^{abc}	410.73±17.48 ^a	323.48±22.92 ^{bc}	329.84±8.31 ^{bc}	301.70±29.50 ^c	380.22±31.43 ^{ab}
Observed species	212.95±3.44 ^{ab}	234.08±6.64 ^a	201.92±9.68 ^{ab}	198.30±5.47 ^{ab}	186.58±17.10 ^b	213.30±19.75 ^{ab}
Shannon index	6.53±0.10 ^a	6.71±0.11 ^a	6.45±0.13 ^a	6.35±0.11 ^a	6.09±0.23 ^a	6.19±0.40 ^a
Simpson index	0.97±0.00 ^a	0.98±0.00 ^a	0.97±0.00 ^a	0.97±0.00 ^a	0.96±0.01 ^a	0.95±0.02 ^a
Pielou-e	0.84±0.01 ^a	0.85±0.01 ^a	0.84±0.01 ^a	0.83±0.01 ^a	0.81±0.02 ^a	0.80±0.04 ^a
Faith-pd	18.19±0.19 ^a	18.89±0.48 ^a	16.97±1.45 ^{ab}	16.91±0.44 ^{ab}	14.91±1.00 ^b	17.86±1.11 ^a
Good's coverage	0.89±0.00 ^{abc}	0.87±0.01 ^c	0.90±0.01 ^{ab}	0.89±0.00 ^{ab}	0.90±0.01 ^a	0.88±0.01 ^{bc}

组均出现降低, 说明 CF 组中微生物的丰富度和均匀度出现降低; 特别值得注意的是, 与 CF 组相比, EF 组 Chao 指数出现明显升高, 且呈

显著差异($P < 0.05$)。

2.11.2 门水平上的菌群热图及相对丰度分析

如图 10A 所示, 与 NC 组相比, 厚壁菌门

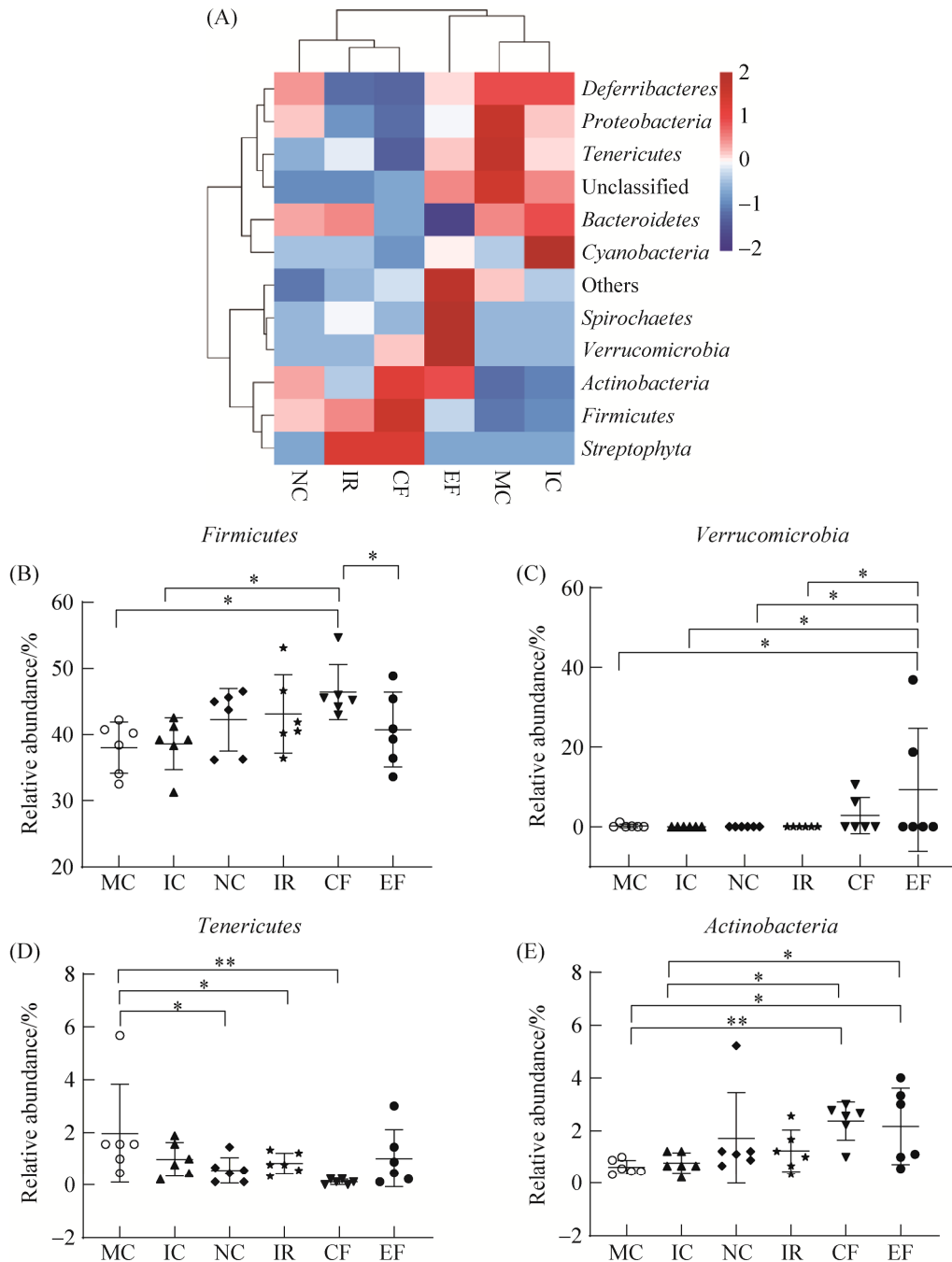


图 10 各组小鼠肠道微生物门水平上的菌群热图及相对丰度

Figure 10 Heatmap and flora composition at the level of phylum in various groups of mice. A: heatmap of the the level of phylum flora; B-E: changes in the abundance of *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Tenericutes* and *Actinobacteria*, respectively.

(*Firmicutes*)的相对丰度在 CF 组中有一定的提高, 但无显著差异($P>0.05$); EF 组 *Firmicutes* 的相对丰度比 CF 组降低 13.94% ($P<0.05$) (图 10B)。疣微菌门(*Verrucomicrobia*)的相对丰度在 EF 组最高, 而在 MC 组、IC 组、NC 组和 IR 组中没有 *Verrucomicrobia*, 说明灌胃粪肠球菌 MG 2108 可以增加小鼠肠道有益菌门 *Verrucomicrobia* 的相对丰度(图 10C)。在 CF 组中没有柔膜菌门(*Tenericutes*), 其相对丰度为 0, 且与 MC 组相比, 差异显著($P<0.01$), 说明环丙沙星治疗对小鼠的肠道微生物群落结构的改变有别于粪肠球菌 MG 2108 的治疗(图 10D)。与 IC 组相比, CF 组和 EF 组放线菌门(*Actinobacteria*)的相对丰度均增加, 分别提高了 205.18% ($P<0.05$)和 178.21% ($P<0.05$) (图 10E)。

2.11.3 属水平上的菌群相对丰度及热图分析

由图 11A 所知, 肠杆菌属(*Enterorhabdus*)和紫单胞菌属(*Muribaculum*)的相对丰度在 CF 组中最高。而相比 CF 组, 它们在 EF 组中的丰度分别降低 122.89% ($P<0.05$) (图 11B)和 59.68% ($P<0.01$) (图 11C), 接近于 NC 组。另枝菌属(*Alistipes*)的相对丰度在 MC 组、IC 组、NC 组、IR 组和 EF 组均高于 CF 组, 差异显著($P<0.05$) (图 11D)。可以看到, 疣微菌门的阿克曼菌属(*Akkermansia*)只存在于 CF 组和 EF 组中, 与 CF 组相比, EF 组的 *Akkermansia* 的相对丰度有所升高, 增加了 230.38% (图 11E)。经过环丙沙星和粪肠球菌 MG 2108 的治疗后, 可以显著提高 *Akkermansia* 的相对丰度, 但是粪肠球菌 MG 2108 治疗效果更好。

2.12 GC-MS 测定粪便中 SCFAs 含量

为了进一步验证小鼠的抗炎作用是否与肠道微生物对宿主的直接作用有关, 亦或肠道微生物通过代谢物间接地发挥着抗炎作用, 我们测定了 6 组小鼠粪便中的短链脂肪酸(SCFAs)

含量, 结果如图 12A 所示。IC 组中戊酸(valeric acid)、异戊酸(isovaleric acid)、丙酸(propionic acid)和丁酸(butyric acid)的含量显著低于 MC 组($P<0.05$)。EF 组的戊酸和丙酸的含量显著高于 CF 组($P<0.05$)。但 6 组之间异丁酸(isobutyric acid)和乙酸(acetic acid)的含量无显著差异($P>0.05$)。据文献报道, SCFAs 的含量变化受到肠道菌群的调节。因此, 分析属水平上肠道微生物菌群与 SCFAs 含量之间的相关性结果如图 12-12F 所示, 戊酸与厌氧菌属(*Anaerotignum*)存在正相关的关系(图 12B), 异戊酸与副杆菌属(*Parabacteroides*)存在正相关的关系(图 12C), 丙酸和臭杆菌属(*Odoribacter*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)存在正相关的关系(图 12D-12E), 乙酸和黏液状杆菌属(*Mucispirillum*)存在负相关的关系(图 12F)。因此, 推测肠道菌群自身的丰度和多样性的改变会导致短链脂肪酸含量发生变化, 进而影响肠道的免疫力。

3 讨论

3.1 关于益生菌治疗结肠炎的作用

越来越多的临床证据表明, 很多益生菌为不同类型的乳酸菌, 它们会不同程度地影响肠腔环境、上皮和粘膜屏障功能以及粘膜免疫系统^[20]。肠道微生物失调与异常免疫反应有关, 异常免疫反应往往伴随着炎症细胞因子的异常产生^[21]。经过 *Lactobacillus casei* 和 *Bifidobacterium animalis* 的共同干预后, 血清中的抑炎细胞因子 IL-10 增加, 而促炎细胞因子 C 反应蛋白和 LPS 降低^[22], IL-10 和 TGF- β 是一种激活巨噬细胞的抑制剂, 参与天然免疫反应的动态平衡控制。本研究结果发现, 经过粪肠球菌 MG 2108 的处理后, 改善了小鼠的肠道机械屏障, 这一结果可能与粪肠球菌 MG 2108 对结肠损伤的逆向调节有关, 说明粪肠球菌 MG 2108 的干预有

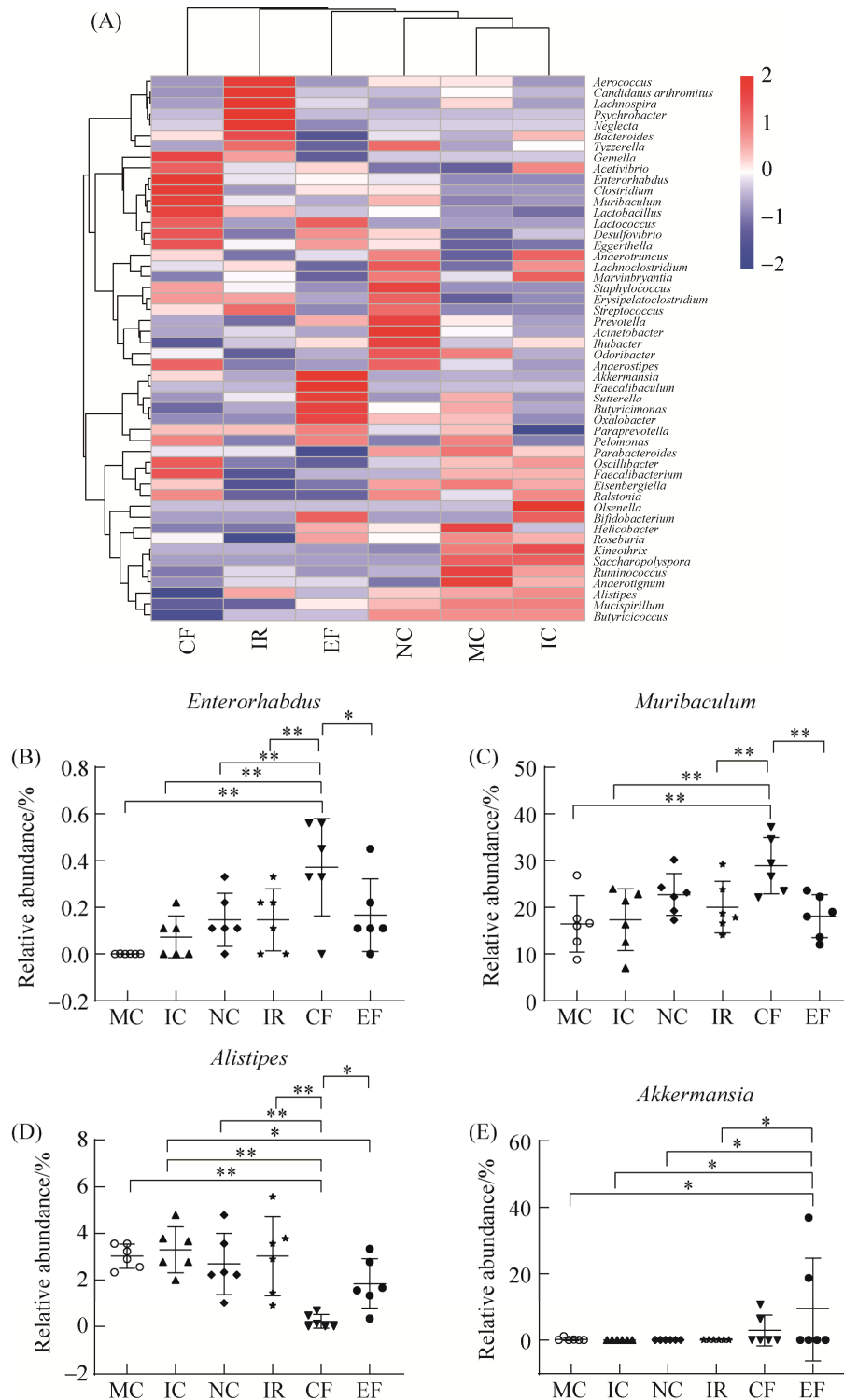


图 11 各组小鼠肠道微生物属水平上的菌群热图及相对丰度

Figure 11 Heatmap and flora composition at the level of genus in various groups of mice. A: heatmap of the level of genus flora; B–E: changes in the abundance of *Enterorhabdus*, *Muribaculum*, *Alistipes* and *Akkermansia*, respectively.

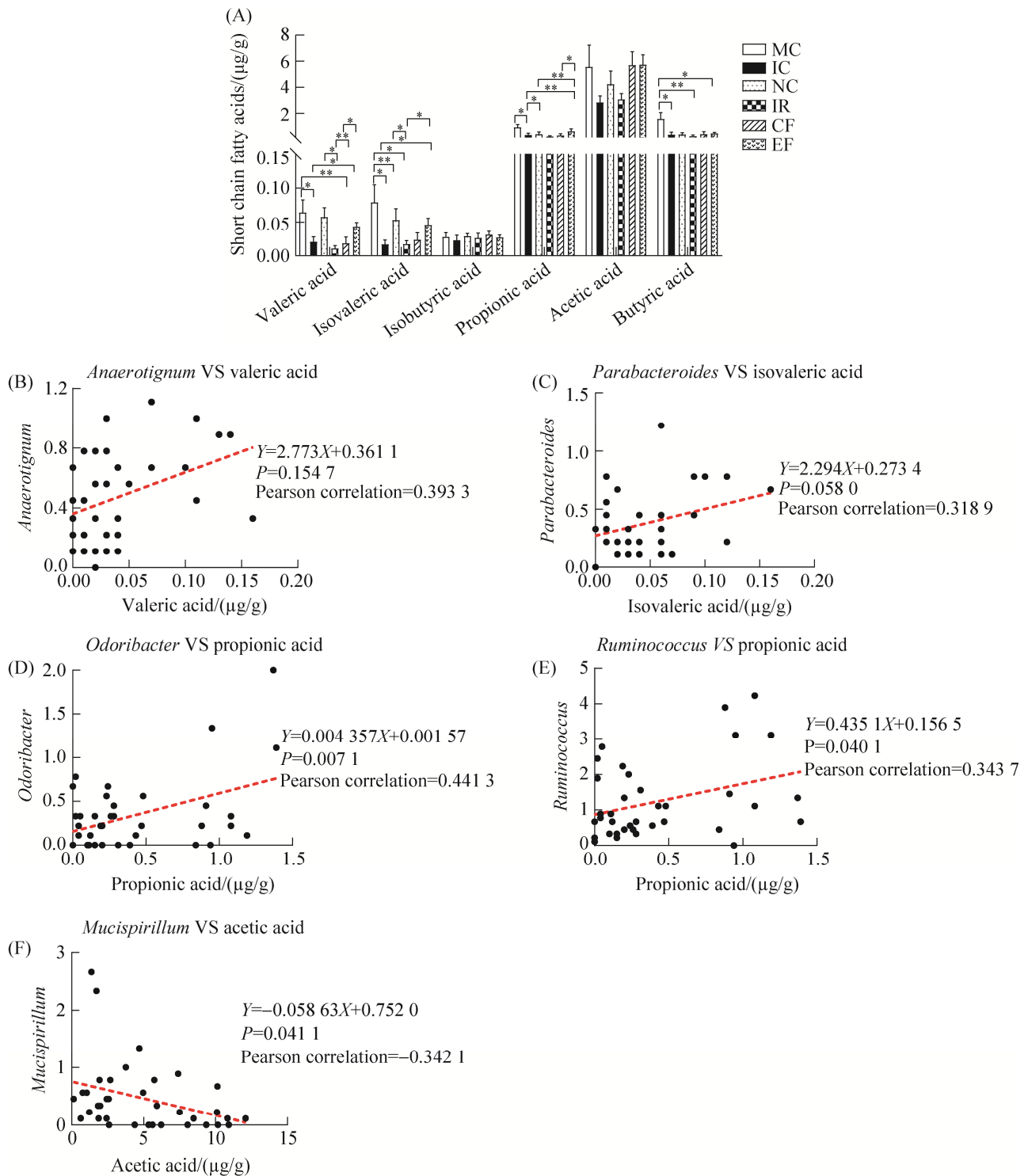


图 12 各组小鼠粪便短链脂肪酸的含量及相关性

Figure 12 Feces short chain fatty acid content and correlation in various groups of mice. A: content of short chain fatty acids; B–F: correlation between valeric acid and *Anaerotignum*, isovaleric acid and *Parabacteroides*, propionic acid and *Odoribacter*, propionic acid and *Ruminococcus*, acetic acid and *Mucispirillum*, respectively.

助于缓解小鼠结肠组织炎症。经过粪肠球菌 MG 2108 的治疗后,小鼠肝脏的 T-SOD 的水平显著升高、MDA 的水平显著降低,说明粪肠球菌 MG 2108 提高了小鼠的抗氧化能力,这有助于改善小鼠的免疫能力。

3.2 粪肠球菌 MG 2108 对小鼠肠道菌群结构的影响

肠道是人体最大的免疫器官,肠道微生物区系被广泛地认为在维持人类健康方面起着重要的作用,肠道菌群的结构和组成反映了微生物和宿主水平的自然选择^[23]。小鼠肠道主要微生物菌群为 *Bacteroidetes* 和 *Firmicutes* 等^[24],有研究表明,灌胃鼠类柠檬酸杆菌引起小鼠肠道微生物菌群的组成和多样性产生了相应变化^[25-28],与本研究结果一致。粪肠球菌 MG 2108 干预后的小鼠肠道微生物菌群结构有所改变, *Akkermansia* 的相对丰度显著提高, *Enterorhabdus* 和 *Muribaculum* 的相对丰度有所下降。 *Akkermansia* 是一种存在于黏液层中的黏液蛋白降解细菌,可以帮助维持消化道的健康,减少炎症、糖尿病和肥胖的风险^[29]; *Enterorhabdus* 为条件致病菌,一般利用柠檬酸盐和丙二酸盐作为唯一的碳源和能源,可引起感染,并产生对动物体有害的组胺^[30]; *Muribaculum* 是革兰氏阴性无芽胞厌氧菌,在大肠肿瘤、胃癌及克罗恩病等胃肠道疾病中检出率升高^[31]。这些结果充分说明了灌胃粪肠球菌 MG 2108 不仅可以降低小鼠肠道有害菌的丰度,而且还能增加小鼠肠道有益菌的丰度,维持整个小鼠肠道菌群的动态平衡和肠道健康。

3.3 粪肠球菌 MG 2108 对 SCFAs 含量的影响

结肠微生物菌群和未消化的碳水化合物通过发酵作用产生 SCFAs, SCFAs 被认为是肠道微生物菌群和免疫系统之间信息传递的介质,

在动物疾病的发生和发展过程中起着重要的作用^[32]。近年研究表明, SCFAs 能够有效保护啮齿动物和人类免受炎症相关损伤,并通过调节宿主肠道免疫减少肠道炎症的发生^[33]。研究表明,添加乳酸菌后改变了肠道微生物菌群结构,从而影响了 SCFAs 的产生^[34-36],导致了肠道免疫力的不同。本研究相关结果表明,鼠类柠檬酸杆菌诱导了结肠炎症,炎症组和空白对照组戊酸、异戊酸和丙酸 SCFAs 含量差异明显。经过粪肠球菌 MG 2108 的干预后, EF 组戊酸、异戊酸和丙酸含量最接近正常对照组。推断粪肠球菌 MG2108 通过改善小鼠肠道菌群失调,增加了肠道菌群的丰度和多样性,导致相应的短链脂肪酸的含量变化,从而减轻了结肠炎症。

3.4 益生菌代替抗生素对小鼠免疫力的影响

益生菌是农业部批准的有益于动物肠道健康的绿色添加剂^[37]。有研究表明,枯草芽胞杆菌和屎肠球菌的益生菌制剂在保护或促进机体免疫力方面明显优于硫酸黏杆菌素和庆大霉素等抗生素^[38]。本文研究结果显示,粪肠球菌 MG 2108 和环丙沙星都可以治疗由鼠类柠檬酸杆菌引起的小鼠结肠炎症,均可通过提高抗氧化能力和增加释放抗炎因子,各项指标均优于自然恢复组。值得强调的是,粪肠球菌 MG 2108 治疗效果更优于环丙沙星。

同时,从各项研究指标分析推断,抗生素和粪肠球菌 MG 2108 治疗小鼠的结肠炎症的机制是不同的。环丙沙星的作用机制是通过自身对鼠类柠檬酸杆菌的抑制作用,从而改善了小鼠结肠炎症,但其在一定程度上损坏了小鼠的肠道微生物菌群;而粪肠球菌 MG 2108 的作用机制是通过小鼠肠道微生物菌群结构的改善,改变和平衡不同 SCFAs 的含量,以达到抑制结肠炎症的效果。IR 组效果差于粪肠球菌和抗生素

治疗组,很可能与 *Akkermansia* 的丰度差别有关。

4 结论

粪肠球菌 MG 2108 可以通过改善小鼠肠道微生物菌群结构,改变和平衡不同 SCFAs 的含量,改善机体的抗氧化能力,抑制鼠类柠檬酸杆菌诱导的小鼠结肠炎症。为其进一步在生产中的应用提供了科学依据。

参考文献

- [1] Johansson MEV, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16(10): 639–649.
- [2] Ramalingam AJ. History of antibiotics and evolution of resistance. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2015, 8(12): 1719.
- [3] Nicolaou KC, Rigol S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics*, 2018, 71(2): 153–184.
- [4] Griggs JP, Jacob JP. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *Journal of Applied Poultry Research*, 2005, 14(4): 750–756.
- [5] Clardy J, Fischbach MA, Currie CR. The natural history of antibiotics. *Current Biology*, 2009, 19(11): R437–R441.
- [6] Brooks G, Ornston LN. Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 2007, 7(3): 273.
- [7] Azad MAK, Sarker M, Li TJ, Yin J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 9478630.
- [8] Naghmouchi K, Belguesmia Y, Bendali F, Spano G, Seal BS, Drider D. *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(20): 3387–3399.
- [9] Seddik HA, Bendali F, Gancel F, Fliss I, Spano G, Drider D. *Lactobacillus plantarum* and its probiotic and food potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2017, 9(2): 111–122.
- [10] Tannock GW, Cook G. *Enterococci* as members of the intestinal microflora of humans. *The Enterococci*. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014: 101–132.
- [11] Delpech G, Hebert EM, Sparo M, Saavedra L. Draft genome sequence of *Enterococcus faecalis* strain CECT7121, a corn silage isolate with antibacterial activity against Gram-positive pathogens. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8(20): e00245–e00219.
- [12] 魏清甜. 粪肠球菌替代饲用抗生素对保育仔猪生产、免疫、肠道发育及肠道微生物的影响. 南京农业大学硕士学位论文, 2014.
- [13] Choi EJ, Lee HJ, Kim WJ, Han KI, Iwasa M, Kobayashi K, Debnath T, Tang YJ, Kwak YS, Yoon JH, Kim EK. *Enterococcus faecalis* EF-2001 protects DNBS-induced inflammatory bowel disease in mice model. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0210854.
- [14] 莫海燕. 饲用粪肠球菌、戊糖片球菌发酵工艺研究. 石河子大学硕士学位论文, 2013.
- [15] Fritzenwanker M, Kuenne C, Billion A, Hain T, Zimmermann K, Goesmann A, Chakraborty T, Domann E. Complete genome sequence of the probiotic *Enterococcus faecalis* symbioflor 1 clone DSM 16431. *Genome Announcements*, 2013, 1(1): e00165–e00112.
- [16] 实验动物管理条例. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4(2): 66–67.
Regulations on the management of laboratory animals. *Practical Journal of Organ Transplantation (Electronic Version)*, 2016, 4(2): 66–67. (in Chinese)
- [17] Xie MG, Fei YQ, Wang Y, Wang WY, Wang Z. Chlorogenic acid alleviates colon mucosal damage induced by a high-fat diet via gut microflora adjustment to increase short-chain fatty acid accumulation in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 3456542.
- [18] 刘红芳, 邓泽元, 徐靓, 陈华蓉, 刘文群. 乳酸菌源纳米硒对小鼠抗氧化性能的影响. 食品工业科技, 2014, 35(23):360–365.
Liu HF, Deng ZY, Xu L, Chen HR, Liu WQ. Effect of lactic acid bacterially synthesized Se(0) nanoparticles on oxidation resistance in mice. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(23): 360–365. (in Chinese)
- [19] Fei YQ, Wang Y, Pang Y, Wang W, Zhu D, Xie M, Lan S, Wang Z. Xylooligosaccharide modulates gut microbiota and alleviates colonic inflammation caused by high fat diet induced obesity. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 1601.
- [20] Liu Y, Fatheree NY, Mangalat N, Rhoads JM. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2010, 299(5): G1087–G1096.
- [21] Schirmer M, Smeekens SP, Vlamakis H, Jaeger M, Oosting M, Franzosa EA, Ter Horst R, Jansen T, Jacobs L, Bonder MJ. Linking the human gut microbiome to

- inflammatory cytokine production capacity. *Cell*, 2016, 167(4):1125–1136.e8.
- [22] Wang J, Bai X, Peng C, Yu Z, Li B, Zhang W, Sun Z, Zhang H. Fermented milk containing *Lactobacillus casei* Zhang and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* V9 alleviated constipation symptoms through regulation of intestinal microbiota, inflammation, and metabolic pathways. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(12): 11025–11038.
- [23] O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *Embo Reports*, 2006, 7(7): 688–693.
- [24] Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, Griffin NW, Lombard V, Henrissat B, Bain JR. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*, 2013, 341(6150): 1241214.
- [25] Guan G, Wang H, Chen S, Liu G, Xiong X, Tan B, Durairandian V, Al-Dhabi NA, Fang J. Dietary chitosan supplementation increases microbial diversity and attenuates the severity of *Citrobacter rodentium* infection in mice. *Mediators of Inflammation*, 2016, 2016: 1–7.
- [26] Bouladoux N, Harrison OJ, Belkaid Y. The mouse model of infection with *Citrobacter rodentium*. *Current Protocols in Immunology*, 2017, 119: 19.15.1–19.15.25.
- [27] Koroleva EP, Halperin S, Gubernatorova EO, Macho-Fernandez E, Spencer CM, Tumanov AV. *Citrobacter rodentium*-induced colitis: a robust model to study mucosal immune responses in the gut. *Journal of Immunological Methods*, 2015, 421: 61–72.
- [28] Collins JW, Keeney KM, Crepin VF, Rathinam VAK, Fitzgerald KA, Finlay BB, Frankel G. *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(9): 612–623.
- [29] Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, De Vos WM. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(5): 1469–1476.
- [30] Clavel T, Duck W, Charrier C, Wenning M, Elson C, Haller D. *Enterorhabdus caecimuris* sp. nov., a member of the family *Coriobacteriaceae* isolated from a mouse model of spontaneous colitis, and emended description of the genus *Enterorhabdus* Clavel et al. 2009. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(7): 1527–1531.
- [31] 付文政, 张春泽, 贾岩峰. 肠道内菌群结构与大肠肿瘤的相关性. *中国中西医结合外科杂志*, 2016, 22(2): 120–124.
- Fu WZ, Zhang CZ, Jia YF. Relationship of microbial community structure in intestine with colorectal cancer. *Chinese Journal of Surgery of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2016, 22(2): 120–124. (in Chinese)
- [32] Den Besten G, Van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 2013, 54(9): 2325–2340.
- [33] Chen JZ, Vitetta L. Inflammation-modulating effect of butyrate in the prevention of colon cancer by dietary fiber. *Clinical Colorectal Cancer*, 2018, 17(3): e541–e544.
- [34] Wang JJ, Zhang QM, Ni WW, Zhang X, Li Y, Li AL, Du P, Li C, Yu SS. Modulatory effect of *Lactobacillus acidophilus* KLDS 1.0738 on intestinal short-chain fatty acids metabolism and GPR41/43 expression in β -lactoglobulin-sensitized mice. *Microbiology and Immunology*, 2019, 63(8): 303–315.
- [35] Cremon C, Guglielmetti S, Gargari G, Taverniti V, Castellazzi AM, Valsecchi C, Tagliacarne C, Fiore W, Bellini M, Bertani L, Gambaccini D, Cicala M, Germanà B, Vecchi M, Pagano I, Barbaro MR, Bellacosa L, Stanghellini V, Barbara G. Effect of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 on symptoms, gut microbiota, short chain fatty acids, and immune activation in patients with irritable bowel syndrome: a pilot randomized clinical trial. *United European Gastroenterology Journal*, 2018, 6(4): 604–613.
- [36] Berni Canani R, Sangwan N, Stefka AT, Nocerino R, Paparo L, Aitoro R, Calignano A, Khan AA, Gilbert JA, Nagler CR. *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *The ISME Journal*, 2016, 10(3): 742–750.
- [37] Gould K. Antibiotics: from prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 71(3): 572–575.
- [38] 肖宏德, 肖运才, 何熙贞, 徐伟, 王喜亮, 毕丁仁, 石德时. 用益生菌制剂代替断奶仔猪日粮中抗生素的研究. *动物医学进展*, 2014, 35(3): 53–58.
- Xiao HD, Xiao YC, He XZ, Xu W, Wang XL, Bi DR, Shi DS. Study on probiotic agents substituting for antibiotics in weaned piglet diets. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(3): 53–58. (in Chinese)