



维生素 E 对高精料诱导亚急性瘤胃酸中毒奶牛粪便微生物群落的影响

吴柯, 冼振宇, 熊浩铭, 伍梓斌, 张家豪, 孙宝丽*, 郭勇庆*

华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642

吴柯, 冼振宇, 熊浩铭, 伍梓斌, 张家豪, 孙宝丽, 郭勇庆. 维生素 E 对高精料诱导亚急性瘤胃酸中毒奶牛粪便微生物群落的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 238-253.

WU Ke, XIAN Zhenyu, XIONG Haoming, WU Zibin, ZHANG Jiahao, SUN Baoli, GUO Yongqing. Vitamin E alters the fecal microbial community in dairy cows with subacute rumen acidosis induced by a high-concentrate diet[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 238-253.

摘要: 【目的】研究高精料诱导亚急性瘤胃酸中毒(subacute rumen acidosis, SARA)和添加维生素 E (vitamin E, VE)调控下, 奶牛粪便中微生物群落的变化, 评估其对奶牛机体代谢的潜在影响, 以期为探索 SARA 的生理机制提供数据支撑。【方法】选取 7 头装有瘤胃瘘管的经产荷斯坦奶牛, 分为 3 期开展, 每期 18 d。第一期为对照期(CON 期), 日粮精粗比为 50:50 [干物质基础(dry matter basis, DM 基础)]; 第二期为诱导期(HG 期), 用占日粮 15% (DM 基础)的细粉小麦替代日粮中粗饲料, 以期诱导奶牛发生 SARA; 第三期为调控期(HGE 期), 在诱导期日粮基础上添加 12 000 IU/d/头的 VE。每期第 18 天为采样期, 采集粪使用来测定微生物群落。【结果】3 个处理期的粪便中微生物群落结构存在差异, 并且 HG 期的 Shannon 指数显著低于 CON 期($P<0.05$)。对门和属水平上的物种进行分析发现, 与 CON 期相比, HG 期的 *Proteobacteria* 和 *Blautia* 相对丰度显著升高 ($P<0.05$), *unidentified_bacteria*、*Euryarchaeota*、*Desulfobacterota*、*Rikenellaceae_RC9_gut_group* 和 *Alistipes* 相对丰度显著降低($P<0.05$)。与 HG 期相比, HGE 期的 *Blautia* 相对丰度显著升高 ($P<0.05$)。功能预测分析表明, SARA 造成奶牛机体代谢紊乱, VE 可能通过提高微生物生长繁殖的稳定性, 促进肠道健康微生物群落增殖, 以调节肠道内环境和促进肠道健康。【结论】高精料诱导 SARA 导致奶牛肠道微生物多样性降低, 使奶牛机体代谢紊乱; 在 VE 调控下, 能通过促进有益肠道微生物群增殖, 调控奶牛肠道健康和维持肠道稳态。

资助项目: 广东省自然科学基金(2019B1515210020); 国家自然科学基金(31872382)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2019B1515210020) and the National Natural Science Foundation of China (31872382).

*Corresponding authors. E-mail: GUO Yongqing, yongqing@scau.edu.cn; SUN Baoli, baolisun@scau.edu.cn

Received: 2023-06-06; Accepted: 2023-09-07; Published online: 2023-09-15

关键词: 奶牛; 亚急性瘤胃酸中毒; 维生素 E; 粪便; 微生物

Vitamin E alters the fecal microbial community in dairy cows with subacute rumen acidosis induced by a high-concentrate diet

WU Ke, XIAN Zhenyu, XIONG Haoming, WU Zibin, ZHANG Jiahao, SUN Baoli*, GUO Yongqing*

College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

Abstract: [Objective] This study aims to observe the changes of the fecal microbial communities in the dairy cows with subacute rumen acidosis (SARA) induced by a high-concentrate diet and modulated by the addition of vitamin E (VE). The potential effects on the metabolism of dairy cows were evaluated to provide data for exploring the physiological mechanisms of SARA. [Methods] Seven multiparous Holstein cows with rumen fistulas were selected for this trial which was carried out in three phases of 18 days each. The first phase was the control (CON) phase, with a concentrate-to-forage ratio of 50:50 in the diet (dry matter basis). The second phase was the induction (HG) phase, in which the forage was replaced with wheat flour at 15% of the diet (dry matter basis) to induce SARA. The third phase was the regulation (HGE) phase, in which VE was added at 12 000 IU/d/cow on the basis of the diet in the HG phase. The feces samples were collected on day 18 in each phase, and the microbial communities in the samples were examined. [Results] The fecal microbial community structure showed significant differences between three phases and the Shannon index in the HG phase was lower than that in the CON phase ($P < 0.05$). The HG phase had higher relative abundance of *Proteobacteria* and *Blautia* and lower relative abundance of unidentified_bacteria, *Euryarchaeota*, *Desulfobacterota*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group*, and *Alistipes* than the CON phase ($P < 0.05$). The relative abundance of *Blautia* in the HGE phase was higher than that in the HG phase ($P < 0.05$). The functional prediction results showed that SARA caused metabolic disorders in the dairy cows, while VE regulated the intestinal microbiota and health by improving the stability of microbial growth and promoting microbial reproduction. [Conclusion] The SARA induced by a high-concentrate diet led to reduced intestinal microbial diversity and metabolic disorders in dairy cows. VE can regulate intestinal health and maintain intestinal homeostasis by promoting the proliferation of beneficial intestinal microorganisms.

Keywords: dairy cows; subacute ruminal acidosis; vitamin E; feces; microorganisms

随着我国经济高速增长和人民生活水平不断提高, 生产结构不断优化, 奶业得到迅猛的发展。在现代奶牛生产中, 饲喂高产奶牛主要挑战是在

保持瘤胃功能正常的同时, 让奶牛采食更多的精饲料来满足产奶的需求^[1]。但是, 这种饲喂方式会削弱奶牛的咀嚼和反刍活动, 降低碱性唾液的分泌

泌,影响瘤胃功能^[2]。日粮中的淀粉可在瘤胃中快速发酵,产生大量挥发性脂肪酸(volatile fatty acids, VFA),降低瘤胃 pH 值^[3]。缺少唾液缓冲液的供应及 VFA 的产生会引发瘤胃代谢紊乱,最终导致奶牛亚急性瘤胃酸中毒(subacute rumen acidosis, SARA)^[4]。国内外研究人员对 SARA 的生理机制开展了大量的研究。汪艳^[5]的研究发现,高精料饲喂奶牛会导致瘤胃蠕动变弱、渗透压升高,致使干物质采食量(dry matter intake, DMI)降低和营养摄入不足,进一步影响奶牛生产性能。Ma 等^[6]发现,饲喂高精料饲料会导致奶牛的乳脂率显著降低; Malekkhahi 等^[7]也发现 SARA 引起奶牛的产奶量显著下降。除了影响生产性能, SARA 还会导致奶牛代谢发生变化并诱发蹄叶炎等疾病。蹄叶炎可使奶牛被淘汰的风险增加,是导致奶牛产业经济损失的主要原因之一^[8]。在 SARA 状态下,奶牛还会出现腹泻,主要因为饲喂大量精料时部分可发酵底物会通过瘤胃进入肠道进行发酵,肠道微生物群落会受到影响,继而影响肠道功能和机体健康^[9]。SARA 会导致奶牛采食量、产奶量和乳脂率降低,使得腹泻和蹄叶炎发病率增加^[10]。因此,有必要开展相关研究,探索 SARA 对奶牛肠道微生物群落的影响及其有效的调控措施。

为了解决 SARA 对奶牛生产带来负面影响的问题,本研究添加维生素 E (vitamin E, VE)调控 SARA。VE 别名生育酚,是一种脂溶性维生素,具有强抗氧化能力和强化机体免疫功能等作用,对阻止低密度脂蛋白氧化和防止动脉粥样硬化起主要作用^[11]。研究表明,VE 作为饲料添加剂可以增强奶牛机体抗氧化能力和免疫力,并提高生产能力^[12]。张德广^[13]发现,在高精料日粮中添加 100 IU/kg VE,可以降低肉牛瘤胃和血浆中脂多糖和其他炎性因子的含量。Bell 等^[14]的研究发现,在日粮中同时添加油料和 VE 可以提高牛奶中乳脂的含量。Moghim-Kandelousi 等^[15]

通过在日粮中添加 VE,可以在一定程度上增加细胞丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,提高抗氧化酶活性,提升奶牛瘤胃和机体的抗氧化能力,降低炎症反应。李云飞^[16]和曲扬华^[17]的研究结果表明,VE 调控后能够提高奶牛 DMI。高精料诱导的 SARA 会降低奶牛的产奶量和乳脂产量,而 VE 调控则会提高产奶量和乳脂率^[18]。另外,VE 对肠道屏障结构蛋白具有保护作用,能够上调肠道黏膜和十二指肠肠道组织中的紧密连接蛋白的表达^[19]。孙岳丞等^[20]发现,VE 对受辛硫磷毒性损伤的小鼠肠道具有一定的改善作用。

根据以上研究,假设高精料日粮诱导 SARA 后奶牛肠道微生物群落会受到损害,日粮添加 VE 有助于调节肠道微生物群组成,减缓 SARA 对奶牛肠道健康的损害。本研究的目的是探索高精料诱导发生 SARA 及添加 VE 对奶牛粪便中微生物群落的影响,以更好地了解与 SARA 相关肠道微生物群落的变化。

1 材料与方法

本研究中所有实验程序都得到了华南农业大学动物实验委员会的批准(编号:2020G012)。

1.1 试验动物和饲养管理

试验选用 7 头装有瘤胃瘘管的经产荷斯坦奶牛[泌乳天数为(63±12) d,体重为(611±26) kg]。试验分为 3 期,每期 18 d。每期的前 3 d 逐步替换日粮,以使奶牛适应新的日粮。第 1 期为对照期(CON),日粮精粗比为 50:50 [干物质基础(dry matter basis, DM 基础)];第 2 期为诱导期(HG),用细粉碎小麦(过 1.5 mm 筛网)替代粗饲料,日粮精粗比为 65:35 (DM 基础);第 3 期为调控期(HGE 期),在诱导期日粮基础上添加 VE (添加量:12 000 IU/(d·头));上海健荷牧业科技有限公司。试验在广东省肇庆市某奶牛场进行,试验牛单栏饲养(2.5 m×2.5 m),地面装有橡胶垫。

饲料以全混合日粮(total mixed ration, TMR)形式饲喂, 自由采食和饮水。每日挤奶(06:30 和 17:30)和饲喂(07:00 和 18:00) 2 次。TMR 组成及营养水平见表 1。

1.2 样品采集

1.2.1 瘤胃液的采集和 pH 的测定

每期第 18 天晨饲前(0 h)和晨饲后 3、6、9 h

和 12 h 通过瘤胃瘘管采集瘤胃前、中、后处瘤胃液, 将其混合, 经高压灭菌的 4 层纱布过滤后, 使用梅特勒-托利多 FE28-Standard pH 计立即测定 pH 值并统计采食后 12 h 内瘤胃 pH 值低于 5.8 的时间, 以判定高精料日粮是否成功诱导奶牛发生 SARA。根据发表的试验结果, 7 头奶牛均诱导产生了 SARA^[18]。

表 1 试验饲料组成及营养水平(干物质基础, %)

Table 1 Composition and nutrient levels of experiment diets (dry matter basis, %)

Items	CON	HG	HGE
Ingredients			
Whole corn silage	24.32	16.78	16.78
Alfalfa hay	13.75	9.69	9.69
Oat hay	11.45	8.32	8.32
Corn	17.00	17.12	17.12
Wheat	0.00	15.19	15.19
Barly	3.00	3.03	3.03
Soybean meal	13.41	13.50	13.50
Whole cotton seed	5.23	5.27	5.27
Wet brewer's grains	4.93	4.14	4.14
Cane molasses	2.65	2.67	2.67
Rumen bypass fat	0.39	0.40	0.40
Mineral-vitamin premix ¹⁾	0.84	0.84	0.84
Calcium hydrogen phosphate	0.36	0.36	0.36
Limestone	1.12	1.13	1.13
Sodium bicarbonate	0.81	0.82	0.82
Potassium chloride	0.07	0.07	0.07
Magnesium oxide	0.31	0.31	0.31
Salt	0.36	0.36	0.36
Nutrient levels ²⁾			
NE _L (MJ/kg)	6.67	6.97	6.97
Crude protein	16.62	16.63	16.63
Neutral detergent fiber	35.81	29.22	29.22
Acid detergent fiber	22.60	17.41	17.41
Ether extract	4.43	4.25	4.25
Starch	21.97	31.28	31.28
Calcium	0.89	0.82	0.82
Phosphorus	0.39	0.41	0.41

¹⁾: Each kilogram of premix contained the following, VA: 1 380 000 IU; VD: 386 400 IU; VE: 9 940 IU; Cu: 2 400 mg; Zn: 20 000 mg; Mn: 15 600 mg; Se: 100 mg; I: 300 mg; Co: 240 mg. ²⁾: Net energy of lactation is a calculated value, while the others are measured value. CON: The control phase; HG: The induction phase; HGE: The regulation phase.

1.2.2 粪便的采集

每期第 18 天晨饲前利用直肠取样法, 采集新鲜粪便样品 150–200 g, 分装于 2 mL 冻存管中, 置于液氮中保存待测。

1.3 样品测序和分析

将样本送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行检测, 测序过程如下: 使用十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 方法提取样本 DNA, 并在 1% 琼脂糖凝胶上检测 DNA 浓度和纯度, 再使用无菌水稀释样本 DNA 至 1 ng/ μ L。以稀释后的样本为模板, 采用带 barcode 的特异引物 341F (5'-CCTAYGG GRBGCASCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACNNG GGTATCTAAT-3') 对 16S rRNA 基因 V3–V4 可变区进行扩增。扩增体系为: 30 μ L, 3 μ L 缓冲液, 15 μ L Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs), 上下引物各 0.2 μ mol/L, 10 ng DNA 模板, 2 μ L 超纯水。扩增程序如下: 98 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。根据 PCR 产物浓度进行等浓度混样, 充分混匀后使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物, 对目标条带使用 GeneJET Gel Extraction Kit 回收试剂盒 (Thermo Scientific) 回收产物。使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒 (Illumina) 进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量, 文库合格后, 使用 NovaSeq 6000 进行上机测序。

测序得到原始数据后, 使用 FLASH 软件对每个样本的序列进行拼接, 得到的拼接序列为原始序列数据^[21]; 使用 Trimmomatic 软件对拼接后的原始数据过滤处理得到有效数据^[22]。基于 97% 的一致性, 对分类操作单元 (operational taxonomic units, OTUs) 进行聚类, 然后对 OTUs 的序列进行物种分类分析。分析不同组之间共有和特有的 OTUs, 使用 R 软件 (version 2.15.3) 和

GraphPad Prism (version 8.0.2) 绘图。使用 QIIME 软件 (version 1.9.1) 计算 Chao1、Shannon、Simpson、Ace 和 Goods-coverage 指数。线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 使用 LEfSe 软件, 设置 LDA (linear discriminant analysis) Score 的筛选值为 4。基于 Tax4Fun 数据库预测微生物区系的功能。

1.4 数据统计和分析

本研究 α 多样性指数、粪便微生物群落结构数据、KEGG 谱通路相对丰度数据采用 SAS (版本 9.4, SAS Institute Inc.) 进行分析。使用 UNIVARIATE 程序测试数据的正态性。基于绝对学生化残差值 >3 处理异常值。使用 GLM 程序进行分析。分析模型为: $Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + C_k + \varepsilon_{ijk}$, 其中 Y_{ij} 是因变量值; μ 是总体均值; T_i 是日粮 i 的固定效应 ($i=1-3$); P_j 是试验期 j 的固定效应 ($j=1-3$); C_k 是试验牛只 j 的随机效应 ($j=1-7$); ε_{ijk} 是随机误差。利用 Tukey 多重比较方法检验各种处理之间的显著差异 ($P < 0.05$)。数据以最小二乘均值表示。

2 结果与分析

2.1 高精料诱导 SARA 及 VE 调控对奶牛粪便 OTUs 的影响

将所有粪便样品在 Illumina NovaSeq 平台进行 16S rRNA 基因 V3–V4 区的高通量测序, 经过质控平均得到 77 377 条有效数据。基于 97% 的一致性, 将序列聚类得到 2 036 个 OTUs, 各组共享和特有的 OTUs 如图 1 所示, 3 期共有 1 176 个相同的 OTUs 数, 占总数的 57.76%。3 期的特有 OTUs 数分别为 CON 期 123 个、HG 期 164 个和 HGE 期 169 个, 所占总数比例分别为 6.04%、8.06% 和 8.30%。3 期的 OTUs 大体一致, 表明样品中的主要微生物群相似, 并且这些 OTUs 可能代表试验牛只的核心粪便微生物群。

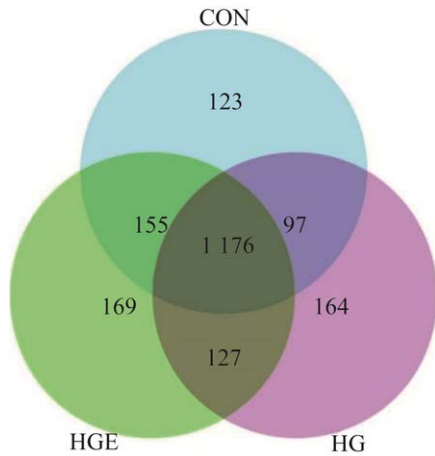


图 1 高精料诱导和 VE 调控下奶牛粪便微生物群的韦恩图

Figure 1 Venn diagram of microbiota under high concentrate induction and VE modulation. CON: The control phase; HG: The induction phase; HGE: The regulation (HGE) phase. The same below.

2.2 高精料诱导 SARA 及 VE 调控对奶牛粪便微生物群多样性的影响

2.2.1 粪便微生物群分析

当测序深度小于 600 reads 时，随着测序深

度的增加，OTUs 数量变化迅速，物种丰富度持续增加。而当测序深度大于 600 reads 时，OTUs 数量变化曲线趋于平缓，这说明测序深度基本覆盖样品的物种，能够反映粪便微生物区系情况。

2.2.2 粪便微生物群落 α 多样性指数分析

本研究通过 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数和 ACE 指数对粪便 OTUs α 多样性进行分析，如图 2 所示。3 期的覆盖值都在 0.99 以上，这表明采样数据足以代表不同样品的整个微生物群。与 CON 期相比，HG 期 Shannon 指数显著降低($P<0.05$)，Chao1 指数和 ACE 指数均有所上升，但差异不显著($P>0.05$)，表明随着高精料诱导，奶牛后肠道微生物的多样性降低，丰富度增加但不显著。与 HG 期对比，HGE 期 Shannon 指数和 Simpson 指数升高($P>0.05$)，Chao1 指数和 ACE 指数均有所下降($P>0.05$)。表明 VE 对奶牛后肠道微生物群具有一定的调控作用。

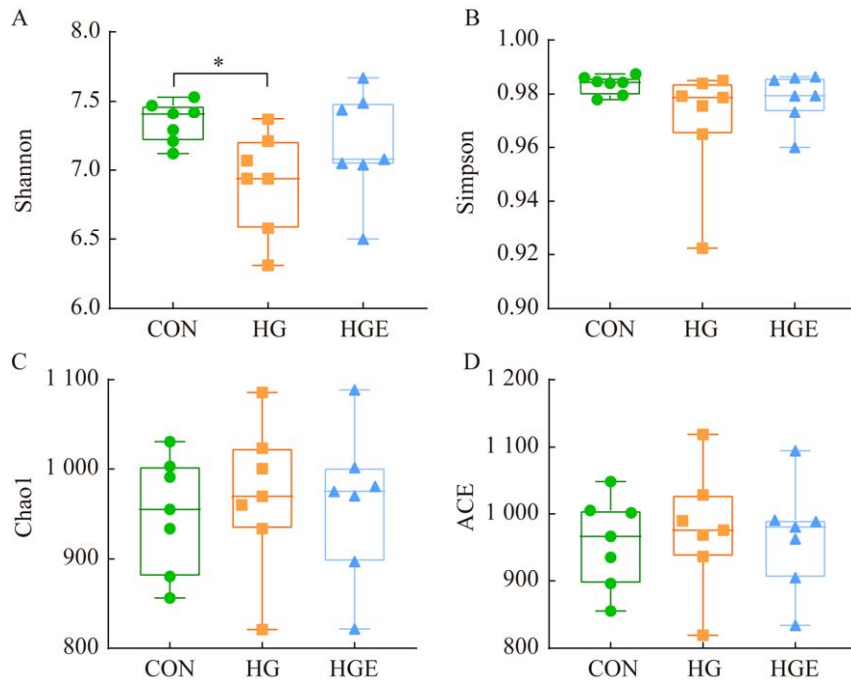


图 2 高精料诱导的 SARA 及 VE 调控对奶牛粪便微生物群 α 多样性影响

Figure 2 Effect of high concentrate induced SARA and VE regulation on alpha diversity of fecal microbiota in dairy cows. A–D: Box plots of Shannon index, Simpson index, Chao1 index, and ACE index. *: $P<0.05$; Each box plot represents the maximum, minimum, median, and interquartile distance.

2.2.3 粪便微生物群 β 多样性分析

β 多样性分析是对不同样品的微生物群组成进行比较。本研究基于 Weighted Unifrac 距离进行主坐标分析(primary coordinate analysis, PCoA), 基于 Bray-Curtis 距离进行无度量多维标度法(non-metric multidimensional scaling, NMDS) 统计, 如图 3 所示。3 个试验期的粪便微生物群样本之间存在相互交杂, 整体呈现 3 种不同聚落, 说明 3 期之间的微生物群结构存在差异性。PCoA 和 NMDS 图反映微生物群大致分布情况, 多元响应置换分析(multiple response permutation procedure, MRPP)能反映期间生物统计上的差异。由表 2 可知, 3 期的 A 值均大于 0, 说明期间的差异均大于期内差异, 分期具有意义。与 CON 期对比, HG 期微生物群结构存在显著差异($P<0.05$)。与 HG 期对比, HGE 期微生物群结构差异不显著($P>0.05$)。

2.3 高精料诱导 SARA 及 VE 调控对奶牛粪便微生物群结构组成的影响

在不同分类水平上对粪便样本进行物种注释, 共鉴定出 24 个门、48 个纲、116 个目、188 个科、377 个属和 206 个种。以下从门和属水平上分别选取相对丰度在前 10 和前 30 的微生物

群进行分析。基于门水平研究发现(图 4A), 厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)是各期主要的菌门, 是奶牛后肠道的优势菌门。*Firmicutes* 在各期的相对丰度分别为 51.81%、54.36%和 60.80%; *Bacteroidetes* 在各期的相对丰度分别为 38.29%、31.56%和 27.51%。相比 CON 期, HG 期的 *Bacteroidetes* 相对丰度显著降低($P<0.05$)。除此之外, 还鉴定了 4 种平均相对丰度大于 1%的次要菌门, 包括放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、螺旋菌门(*Spirochaetes*)和 unidentified_bacteria。相比 CON 期, HG 期的 *Proteobacteria* 相对丰度显著升高($P<0.05$), unidentified_bacteria、广古菌门(*Euryarchaeota*)和脱硫菌门(*Desulfobacterota*)相对丰度显著降低($P<0.05$)。

在属水平上, 由图 4B 可知, 微生物群相对丰度在 1%以上的有 9 个, 分别为 UCG-005 属、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、理研菌科 RC9 肠道群(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)、普雷沃氏菌科 UCG-003 属(*Prevotellaceae_UCG-003*)、密螺旋体菌属(*Treponema*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、琥珀酸弧菌属(*Succinivibrio*)、梭状芽孢杆菌属(*Clostridium_sensu_stricto_1*)和另枝菌属(*Alistipes*)。

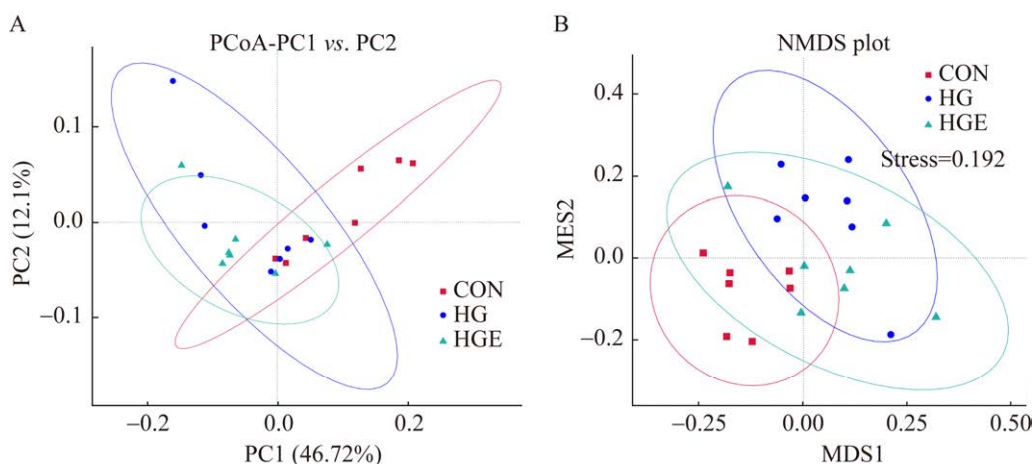


图 3 高精料诱导的 SARA 及 VE 调控对奶牛粪便微生物群 β 多样性影响

Figure 3 Effect of high concentrate induced SARA and VE regulation on beta diversity of fecal microbiota in dairy cows. A: PCoA analysis based on Weighted Unifrac distance. B: NMDS analysis based on Bray-Curtis distance.

表 2 MRPP 期间差异分析

Period	A	Observed-delta	Expected-delta	Significance
CON-HG	0.087	0.379	0.415	0.001
HG-HGE	0.004	0.412	0.413	0.345
CON-HGE	0.064	0.357	0.381	0.007

UCG-005 属是各期的优势菌属, 相对丰度分别为 16.51%、16.05%和 20.84%。与 CON 期对比, HG 期的 *Rikenellaceae_RC9_gut_group* 和 *Alistipes* 相对丰度显著降低($P<0.05$), 布劳特氏菌属(*Blautia*) 相对丰度显著升高($P<0.05$)。与 HG 期相比, HGE 期的 *Blautia* 相对丰度显著升高($P<0.05$)。

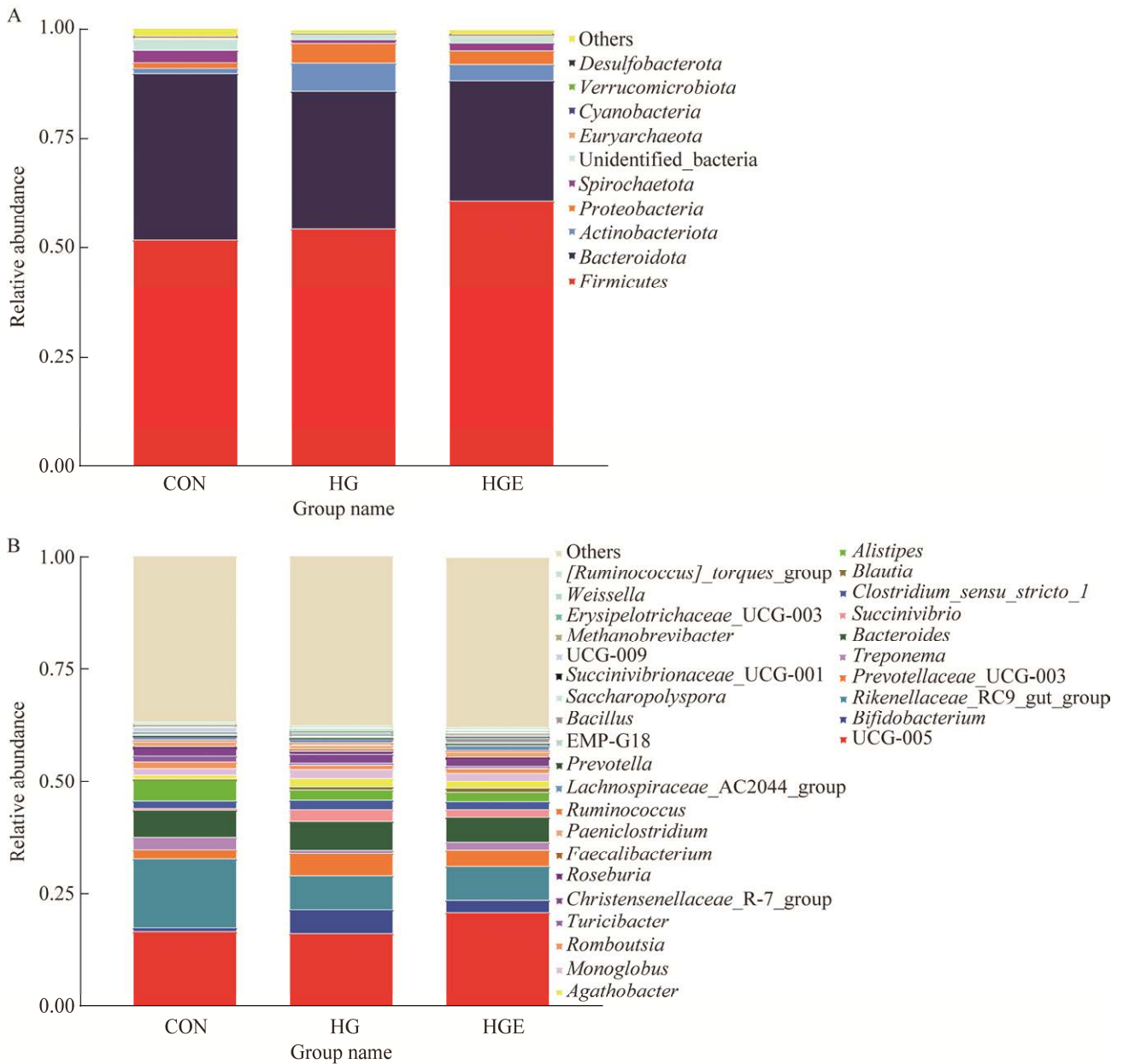


图 4 粪便微生物群结构组成

Figure 4 Structural composition of fecal microbiota. A: Structure of fecal microbiota phylum. B: Structure of fecal microbiota genus.

2.4 高精料诱导 SARA 及 VE 调控对奶牛粪便微生物群结构差异性的影响

利用 LEfSe 分析工具在期与期之间寻找具有统计学差异的生物标识,并在 3 个期别进行比

较分析的基础上绘制图 5。3 个处理期共统计出 16 种差异菌系,分别为 3 个门、2 个纲、3 个目、5 个科和 3 个属。其中 CON 期有 7 种, HG 期有 7 种, HGE 期有 2 种。3 期相对丰度显著差异的

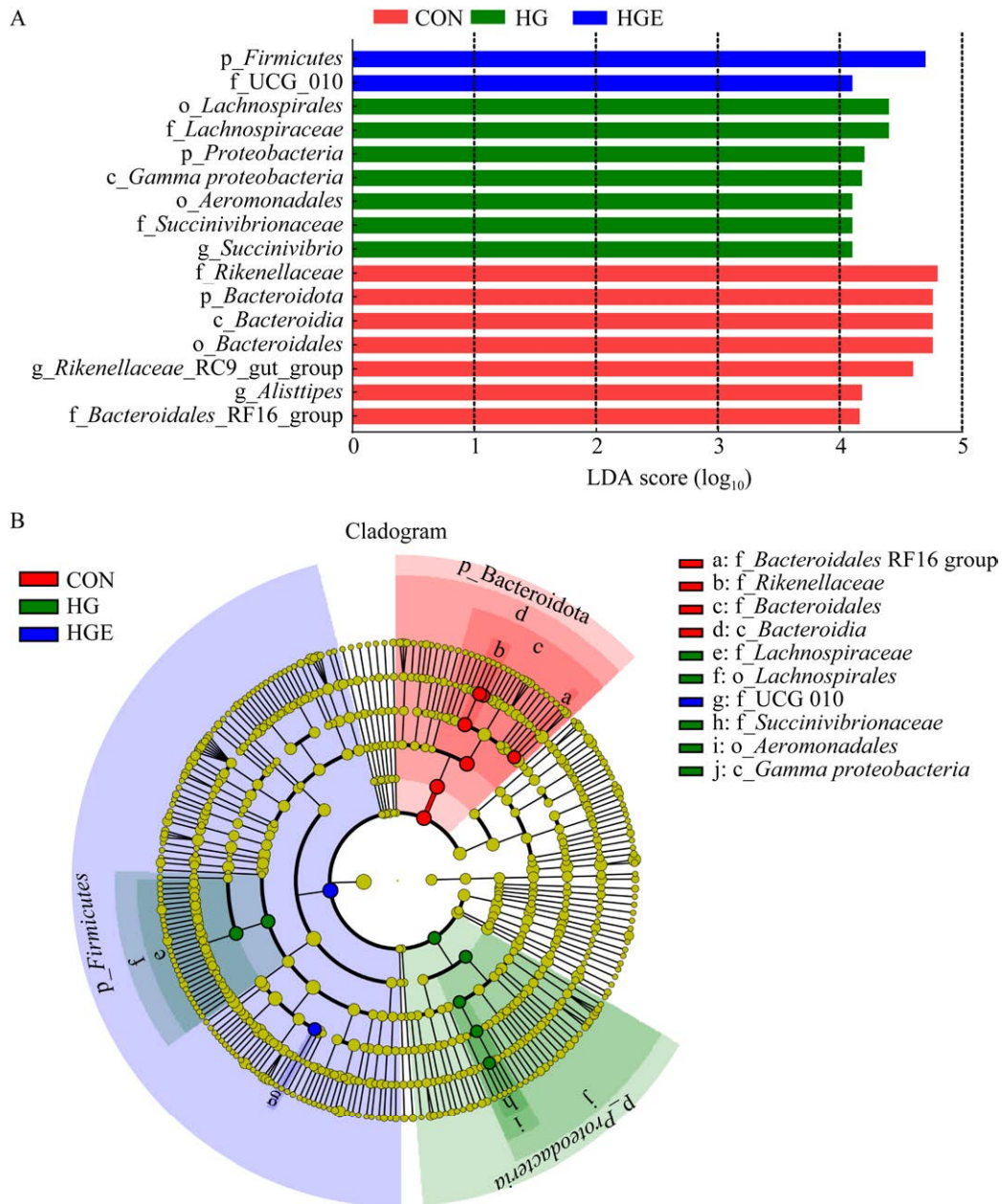


图 5 粪便微生物群结构差异性

Figure 5 Structural variability of fecal microbiota. A: Linear discriminant analysis (LDA) bar graph shows species with LDA score >4. B: LEfSe evolutionary branching graph.

菌门分别为 *Bacteroidota* (CON)、*Proteobacteria* (HG)和 *Firmicutes* (HGE)。3 期相对丰度显著差异的菌属分别为 *Rikenellaceae_RC9_gut_group* (CON)、*Alistipes* (CON)和 *Succinivibrio* (HG)。同时进化分支图可以观察到粪便微生物衍生出多条进化枝, 每条进化支上的差异物种如红、绿、蓝三色的圆表示, 相同颜色的圆串联成独立的进化支。在 3 期差异菌系中, 除 HG 组的毛螺旋菌科(*Lachnospiraceae*)和毛螺旋菌目(*Lachnospirales*) 归属于 HGE 期的 *Firmicutes*, 其余差异菌系在各处理期之间的进化路线保持一定的独立性。HG 期与 HGE 期的进化路线相互夹杂, 表明它们有相近的进化方向, 并与 CON 期存在差异。综上, 高精料诱导的 SARA 及 VE 调控会改变奶牛后肠道中的环境特征, 从而使粪便微生物形成不同的进化方向。

2.5 高精料诱导 SARA 及 VE 调控后奶牛粪便微生物群变化对机体代谢的影响

在本研究中, 为了进一步了解 SARA 和 VE 调控如何影响奶牛后肠的微生物群功能, 对 KEGG 谱(2 级和 3 级)的前 20 条通路进行分析, 在分类和重新梳理后, 主要改变的 KEGG 通路如图 6 所示。在 KEGG 2 级, 结果显示 HG 期的“复制与修复(replication and repair)”“翻译(translation)”“核苷酸代谢(nucleotide metabolism)”和“转录(transcription)”通路富集($P<0.05$), 而“碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)”“多糖合成与代谢(glycan biosynthesis and metabolism)”“运输与分解代谢(transport and catabolism)”“酶家族(enzyme families)”和“细胞过程与信号(cellular processes and signaling)”的相对表达量显著降低($P<0.05$)。HGE 期中, “信号传导(signal transduction)”和“基因调控(genetic information processing)”的相对表达量显著上升($P<0.05$), 而“glycan biosynthesis

and metabolism”“辅助因子与维生素代谢(metabolism of cofactors and vitamins)”“折叠、定位与降解(folding, sorting and degradation)”和“新陈代谢(metabolism)”的相对表达量显著下降($P<0.05$)。

在 KEGG 3 级, 2 条“translation”通路、2 条“replication and repair”通路、3 条“carbohydrate metabolism”通路、2 条“nucleotide metabolism”、“外泌体(exosome)”通路、“ABC 转运蛋白(ABC transporters)”通路、“丙氨酸和天冬氨酸代谢(alanine aspartate and glutamate metabolism)”通路、“原核生物的固碳途径(carbon fixation pathways in prokaryotes)”通路和“蛋白酶(peptidases)”通路受到不同处理期的影响。其中, “DNA 修复和重组蛋白(DNA repair and recombination proteins)”通路、“转运 RNA 生物合成(transfer RNA biogenesis)”通路、“嘌呤代谢(purine metabolism)”通路、“嘧啶代谢(pyrimidine metabolism)”通路、“ABC transporters”通路和“氨基酸 tRNA 生物合成(aminoacyl tRNA biosynthesis)”通路在 HG 期的相对表达量显著增加($P<0.05$), 而“peptidases”通路、“exosome”通路、“carbon fixation pathways in prokaryotes”通路、“氨基糖和核苷酸糖代谢(amino sugar and nucleotide sugar metabolism)”通路和“alanine aspartate and glutamate metabolism”通路的相对表达量显著减少($P<0.05$)。在 HGE 期中, “丙酮酸盐代谢(pyruvate metabolism)”通路、“糖酵解/糖异生(glycolysis/gluconeogenesis)”通路、“染色体及相关蛋白(chromosome and associated proteins)”通路和“carbon fixation pathways in prokaryotes”通路富集($P<0.05$), 而“amino sugar and nucleotide sugar metabolism”通路的相对表达量显著减少($P<0.05$)。

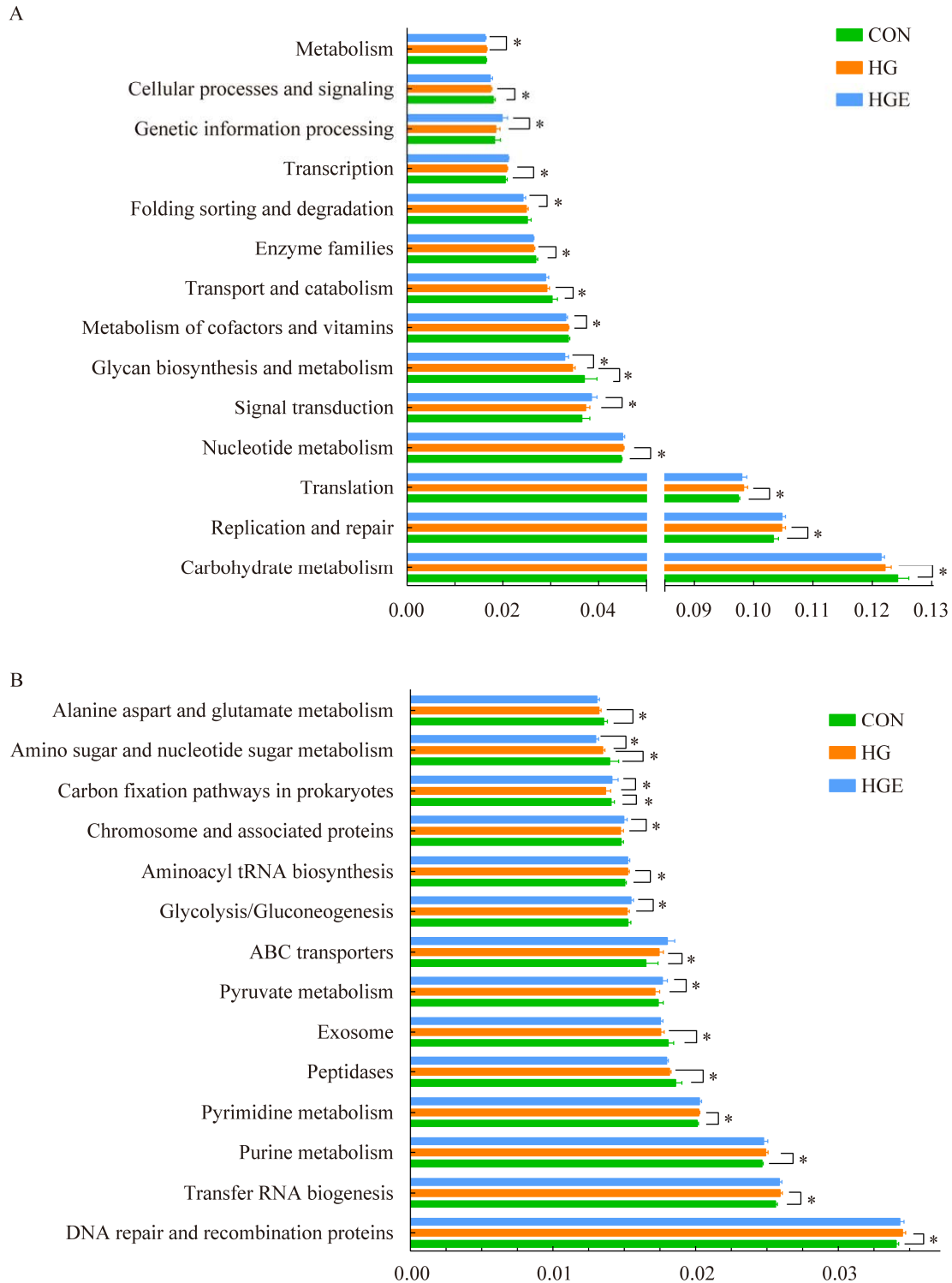


图 6 高精料诱导的 SARA 及 VE 调控对奶牛粪便 KEGG 谱差异分析 A: 2 级. B: 3 级

Figure 6 Analysis of the difference between high concentrate induced SARA and VE modulation on fecal KEGG profiles of dairy cows. A: KEGG level 2. B: KEGG level 3. *: $P < 0.05$.

3 讨论

3.1 高精料诱导 SARA 及 VE 调控对奶牛粪便微生物群落多样性的影响

本研究通过 α 多样性和 β 多样性评估粪便微生物群落多样性。 α 多样性主要包括物种多样性曲线和 α 多样性指数。稀释曲线反映测序数据量的合理性, 当曲线趋于平坦时, 表明测序数据量合理^[23]。3 期的稀释曲线随着测序深度的增加趋于平缓, 说明测序深度基本覆盖样品的微生物物种。等级聚类曲线反映物种的丰富度和均匀度, 横轴跨度越大表示丰富度越高, 曲线越平缓表示物种分布越均匀^[24]。3 个处理期在横轴方向相互重叠, 说明微生物多样性相似; 在纵轴方向曲线逐渐平缓, 说明物种分布均匀。

α 多样性指数主要包括 Shannon、Simpson、Chao1 和 Ace 指数, 其中 Shannon 和 Simpson 指数反映物种多样性, Chao1 和 Ace 指数反映物种丰富度^[25]。结果显示, 相比 CON 期, HG 期的 Shannon 指数显著降低, Simpson 指数下降但不显著, 表明患有 SARA 的奶牛的粪便微生物群落多样性降低。Petri 等^[26]的研究表明, 患有 SARA 的西门塔尔奶牛的 Shannon 和 Simpson 指数都显著低于健康奶牛, 这与本研究结果相似。由于肠黏膜属于单层上皮, 简单的结构使得后肠道上皮更容易受到酸性损伤、屏障损伤等影响^[27-28]。因此 SARA 可能使奶牛后肠道损伤, 破坏微生物群落环境, 继而降低群落多样性。相比 HG 期, HGE 期的 Shannon 和 Simpson 指数上升, 这表明 VE 具有恢复肠道微生物多样性的潜力, 可能是由于 VE 对肠道屏障结构蛋白表达量的上调并不会引起炎症因子的改变^[19], 损伤的肠道未能及时修复, 因此差异不显著。

β 多样性是对不同样本的微生物群落构成进行比较分析。本研究中, 根据 PCoA 和 NMDS

基于不同降维模式的二维坐标图映射可知, 3 期坐标相互交错, 期内样本距离相近, 表明不同试验期之间存在微生物群结构上的差异。MRPP 期间差异分析结果进一步证明了相比 CON 期, HG 期微生物区系存在显著区分, 而 HGE 期与 HG 期相比差异不显著。为了深入探究不同试验期之间的微生物群落结构, 进行了相关的分析并进行讨论。

3.2 高精料诱导 SARA 及 VE 调控对奶牛粪便微生物群落结构的影响

动物胃肠道经过长期共同进化, 形成了细菌、古细菌、真核生物和病毒共存的稳定复杂的微生态环境^[29]。本研究 16S rRNA 基因测序结果表明, 在粪便中细菌占据绝对优势地位(>95%), 而古细菌在总微生物中处于次要地位, 因此主要对微生物群落结构进行分析与讨论。

许多研究报道, 高精料导致的 SARA 会改变奶牛粪便中微生物群落的结构^[30-31]。与之前的研究类似, *Firmicutes* 和 *Bacteroidota* 是 3 个处理期粪便中的优势菌门^[31-32], 但其他次要菌门在不同期中是不同的。与本研究相似, Mao 等^[33]的研究发现 SARA 会降低瘤胃液中的 *Bacteroidota* 和 *Spirochaetota* 的相对丰度, 而本研究中 *Bacteroidota* 的相对丰度显著降低, *Spirochaetota* 相对丰度降低但不显著。El Kaoutari 等^[34]报道了 *Bacteroidota* 比 *Firmicutes* 更有效地降解结构性碳水化合物, 而粪便中 *Firmicutes* 与 *Bacteroidota* 比例的增加可能不利于奶牛利用膳食纤维。与 HG 期相比, HGE 期 *Firmicutes* 和 *Bacteroidota* 的相对丰度无显著差异, 可能由于 VE 对肠道屏障的修复减缓 SARA 对肠道的进一步损伤。本研究中, HG 期 *Proteobacteria* 的相对丰度相比 CON 期显著提高。 *Proteobacteria* 可以降解葡萄糖等小分子碳水化合物^[35], 可能由于日粮组成发生改变, 精

料的含量提高促进 *Proteobacteria* 增殖。*Euryarchaeota* 属于产甲烷菌, 负责瘤胃肠道甲烷的合成, 其在糖酵解和宿主免疫反应中的作用被广泛讨论^[36]。SARA 导致 *Euryarchaeota* 相对丰度显著下降, 可能会降低奶牛机体糖酵解过程和免疫反应, 相反, VE 能提高 *Euryarchaeota* 的相对丰度, 但差异不显著。

为了进一步研究微生物群落结构, 对属水平展开分析与讨论。本研究中, 与 CON 期相比, HG 期 *Rikenellaceae_RC9_gut_group* 和 *Alistipes* 的相对丰度显著降低。相关研究报道 *Rikenellaceae_RC9_gut_group* 在脂质代谢过程起作用^[37]。*Alistipes* 可通过调节乙酸的产生来增加脂质代谢^[38], 而乙酸是糖异生和脂肪生成过程的信号分子, 并作为肠道外周细胞和肝脏的能量来源^[39]。因此 SARA 使 *Rikenellaceae_RC9_gut_group* 和 *Alistipes* 的相对丰度显著下调可能不利于脂质代谢, 对奶牛机体造成肠道功能紊乱的影响。*Blautia* 是一种专性厌氧菌, 能将多糖分解成短链脂肪酸, 它在肠道的存在可能支持健康的微生物组成^[40]。3 期中 HGE 期 *Blautia* 的相对丰度最高, 这可能与 VE 在机体内的代谢产物调节肠道微生物群有关^[41], 说明 VE 有利于提高奶牛肠道健康。为了确定在每期中显著分化的微生物类群, 结合 LEfSe 分析进行了线性判别分析, 结果发现 *Succinivibrio* 在 HG 期显著上调, 这与 Qiu 等^[42]的试验结果相似, 饲喂高谷物组瘤胃中的 *Succinivibrio* 的相对丰度显著提高, 但最近的研究发现 *Succinivibrio* 与饲料效率呈正相关^[43], 与肠道健康无关。

3.3 高精料诱导 SARA 及 VE 调控后奶牛粪便微生物群变化对机体代谢的影响

本研究使用 Tax4Fun 探索不同处理期奶牛粪便细菌功能的差异, 对差异代表的 OTUs 进行标准化, 并根据已识别的 KEGG 通路预测它们

的基因组贡献。对微生物群功能的预测表明, HG 期碳水化合物代谢、多糖合成与代谢和运输与分解代谢等的相对丰度下调, 表明 SARA 使奶牛机体代谢紊乱。与 Zhang 等^[44]的研究相似, 饲喂 8-10 月龄荷斯坦后备牛高精料日粮会降低机体碳水化合物和乙酸代谢。除此之外, HG 期 ABC transporters 的相对丰度上调, 氨基糖和核苷酸糖代谢和丙氨酸天冬氨酸和谷氨酸代谢的相对丰度下调, 这些关键功能途径的失调会导致复发性免疫紊乱和组织损伤^[45]。

在高精料日粮中添加 VE, 上调了信号转导、遗传信息处理和染色体和相关蛋白质等通路, 这揭示了 VE 可能通过提高微生物生长繁殖的稳定性, 促进肠道健康微生物群增殖, 如 VE 显著提高 *Blautia* 的相对丰度, 以调节肠道内环境和促进肠道健康, 但具体增殖的微生物群和调控的具体过程都有待进一步确认。除此之外, VE 的丙酮酸盐代谢和糖酵解/糖异生通路富集。常文露等^[46]的研究表明, VE 能提高高脂高糖饲喂的大鼠血浆中的己糖激酶和丙酮酸激酶。因此, VE 能改善机体氧化应激反应, 提高机体对胰岛素的敏感性, 从而改善血糖水平^[47]。此外, 研究表明糖酵解过程丙酮酸通过以不依赖于 ATP 的方式清除自由基来防止肠道上皮细胞发生凋亡和坏死性凋亡^[48], 可见 VE 对奶牛调控肠道健康和维持肠道稳态具有一定的作用。然而肠道微生物影响机体代谢的具体机制还需要进一步试验探究, 如转录组、代谢组和蛋白组学等, 以确认诱导 SARA 和 VE 调控下肠道微生物在奶牛中的具体功能和作用。

4 结论

综上所述, 高精料诱导 SARA 导致奶牛肠道微生物多样性降低, 添加 VE 具有恢复肠道微生物多样性的潜力。SARA 改变奶牛粪便中微

生物群落的结构, 门水平上显著降低 *Bacteroidota* 和 *Euryarchaeota* 的相对丰度, VE 能提高 *Euryarchaeota* 的相对丰度但差异不显著; 属水平上高精料诱导下 *Rikenellaceae_RC9_gut_group* 和 *Alistipes* 的相对丰度显著降低, *Succinivibrio* 的相对丰度显著提高, VE 显著提高 *Blautia* 的相对丰度。功能预测结果发现, SARA 导致奶牛机体代谢紊乱, 并可能导致奶牛产生复发性免疫紊乱和组织损伤。在 VE 调控下, 能通过促进健康肠道微生物群增殖, 调控奶牛肠道健康和维持肠道稳态。

参考文献

- [1] ASCHENBACH JR, KRISTENSEN NB, DONKIN SS, HAMMON HM, PENNER GB. Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough[J]. *IUBMB Life*, 2010, 62(12): 869-877.
- [2] ASCHENBACH JR, PENNER GB, STUMPF F, GÄBEL G. Ruminant nutrition symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH[J]. *Journal of Animal Science*, 2011, 89(4): 1092-1107.
- [3] IQBAL S, ZEBELI Q, MAZZOLARI A, BERTONI G, DUNN SM, YANG WZ, AMETAJ BN. Feeding barley grain steeped in lactic acid modulates rumen fermentation patterns and increases milk fat content in dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(12): 6023-6032.
- [4] ZEBELI Q, DIJKSTRA J, TAJAJ M, STEINGASS H, AMETAJ BN, DROCHNER W. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet[J]. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(5): 2046-2066.
- [5] 汪艳. 丁酸钠对 SARA 状态下乳腺组织中 NOD1/RIP2 信号通路的调控作用及机制[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2018.
WANG Y. Regulatory effect and mechanism of sodium butyrate on NOD1/RIP2 signaling pathway in breast tissue in SARA state[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [6] MA N, ABAKER JA, WEI G, CHEN H, SHEN X, CHANG G. A high-concentrate diet induces an inflammatory response and oxidative stress and depresses milk fat synthesis in the mammary gland of dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(6): 5493-5505.
- [7] MALEKKHAHI M, TAHMASBI AM, NASERIAN AA, DANESH-MESGARAN M, KLEEN JL, AIZAHAL O, GHAFFARI MH. Effects of supplementation of active dried yeast and malate during sub-acute ruminal acidosis on rumen fermentation, microbial population, selected blood metabolites, and milk production in dairy cows[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, 213: 29-43.
- [8] PLAIZIER JC, KRAUSE DO, GOZHO GN, MCBRIDE BW. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences[J]. *Veterinary Journal*, 2008, 176(1): 21-31.
- [9] PLAIZIER JC, DANESH MESGARAN M, DERAKHSHANI H, GOLDRER H, KHAFIPOUR E, KLEEN JL, LEAN I, LOOR J, PENNER G, ZEBELI Q. Review: enhancing gastrointestinal health in dairy cows[J]. *Animal*, 2018, 12: s399-s418.
- [10] MONTEIRO HF, FACIOLA AP. Ruminal acidosis, bacterial changes, and lipopolysaccharides[J]. *Journal of Animal Science*, 2020, 98(8): skaa248.
- [11] SCHNEIDER C. Chemistry and biology of vitamin E[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005, 49(1): 7-30.
- [12] 安娜. 奶牛不同泌乳阶段产奶性能与营养状况检测指标的相关性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2014.
AN N. Study on the correlation between milk production performance and nutritional status of dairy cows at different lactation stages[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [13] 张德广. 高精料日粮中添加维生素 E 和丙酮酸乙酯对肉牛炎性反应及生产性能的影响[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2016.
ZHANG DG. Effects of vitamin E and ethyl pyruvate on inflammatory reaction and production performance of beef cattle in high concentrate diet[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2016 (in Chinese).
- [14] BELL JA, GRIINARI JM, KENNELLY JJ. Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat[J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(2): 733-748.
- [15] MOGHIMI-KANDELOUSI M, ALAMOUTI AA, IMANI M, ZEBELI Q. A meta-analysis and

- meta-regression of the effects of vitamin E supplementation on serum enrichment, udder health, milk yield, and reproductive performance of transition cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(7): 6157-6166.
- [16] 李云飞. 组胺对 SARA 奶牛中性粒细胞粘附的影响及机制[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2021.
LI YF. Effect of histamine on neutrophil adhesion in SARA dairy cows and its mechanism[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2021 (in Chinese).
- [17] 曲扬华. 维生素 E 对绵羊精子发生的影响及其作用机制[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2018.
QU YH. Effect of vitamin E on spermatogenesis in sheep and its mechanism[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [18] WU ZB, GUO YQ, ZHANG JH, DENG M, XIAN ZY, XIONG HM, LIU DW, SUN BL. High-dose vitamin E supplementation can alleviate the negative effect of subacute ruminal acidosis in dairy cows[J]. *Animals*, 2023, 13(3): 486.
- [19] 黄妍君. 维生素 E 及其衍生物对肠道屏障结构蛋白的保护作用研究[D]. 长沙: 湖南师范大学硕士学位论文, 2018.
HUANG YJ. Protective effect of vitamin E and its derivatives on intestinal barrier structural proteins[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Normal University, 2018 (in Chinese).
- [20] 孙岳丞, 张婧, 宋文涛, 单安山. 辛硫磷对大鼠肠道的毒性损伤及维生素 E 的保护作用[C]//中国畜牧兽医学动物营养学分会. 中国畜牧兽医学动物营养学分会第十二次动物营养学术研讨会论文集. 北京: 中国农业大学出版社, 2016: 665.
SUN YC, ZHANG J, SONG WT, SHAN AS. Toxic injury to the rat intestine by octreotide and the protective effect of vitamin E[C]//Proceedings of the 12th Symposium on Animal Nutrition of the Animal Nutrition Branch of the Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medical Association. Beijing: China Agricultural University Press, 2016: 665 (in Chinese).
- [21] MAGOČ T, SALZBERG SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [22] BOKULICH NA, SUBRAMANIAN S, FAITH JJ, GEVERS D, GORDON JI, KNIGHT R, MILLS DA, CAPORASO JG. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 57-59.
- [23] ZHOU PP, YANG TX, XU MC, ZHAO YJ, SHEN PP, WANG YG. 16S rRNA sequencing-based evaluation of the protective effects of Hua-Zhuo-Jie-Du on rats with chronic atrophic gastritis[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2022, 22(1): 1-14.
- [24] 张惠雯. 花生粕多肽对高脂膳食小鼠生长及脂代谢和肠道的影响[D]. 青岛: 青岛大学硕士学位论文, 2019.
ZHANG HW. Effects of peanut peptide on growth, lipid metabolism and intestine of high-fat dietary mice[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao University, 2019 (in Chinese).
- [25] GRICE EA, KONG HH, CONLAN S, DEMING CB, DAVIS J, YOUNG AC, COMPARATIVE SEQUENCING PROGRAM NC, BOUFFARD GG, BLAKESLEY RW, MURRAY PR, GREEN ED, TURNER ML, SEGRE JA. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome[J]. *Science*, 2009, 324(5931): 1190-1192.
- [26] PETRI RM, ADITYA S, HUMER E, ZEBELI Q. Effect of an intramammary lipopolysaccharide challenge on the hindgut microbial composition and fermentation of dairy cattle experiencing intermittent subacute ruminal acidosis[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(5): 5417-5431.
- [27] TAO SY, DUANMU YQ, DONG HB, TIAN J, NI YD, ZHAO RQ. A high-concentrate diet induced colonic epithelial barrier disruption is associated with the activating of cell apoptosis in lactating goats[J]. *BMC Veterinary Research*, 2014, 10(1): 1-10.
- [28] LI S, KHAFIPOUR E, KRAUSE DO, KROEKER A, RODRIGUEZ-LECOMPTE JC, GOZHO GN, PLAIZIER JC. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(1): 294-303.
- [29] JOSE VL, APPOOTHY T, MORE RP, ARUN AS. Metagenomic insights into the rumen microbial fibrolytic enzymes in Indian crossbred cattle fed finger millet straw[J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 13.
- [30] NEUBAUER V, PETRI RM, HUMER E, KRÖGER I, REISINGER N, BAUMGARTNER W, WAGNER M, ZEBELI Q. Starch-rich diet induced rumen acidosis and hindgut dysbiosis in dairy cows of different lactations[J]. *Animals*, 2020, 10(10): 1727.
- [31] PLAIZIER JC, LI SC, TUN HM, KHAFIPOUR E. Nutritional models of experimentally-induced subacute ruminal acidosis (SARA) differ in their impact on rumen and hindgut bacterial communities in dairy cows[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 7: 2128.
- [32] MAO SY, ZHANG RY, WANG DS, ZHU WY. The diversity of the fecal bacterial community and its

- relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows[J]. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8(1): 1-13.
- [33] MAO SY, ZHANG RY, WANG DS, ZHU WY. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing[J]. *Anaerobe*, 2013, 24: 12-19.
- [34] EL KAOUTARI A, ARMOUGOM F, GORDON JI, RAOULT D, HENRISSAT B. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(7): 497-504.
- [35] WANG C, LU HH, DONG D, DENG H, STRONG PJ, WANG HL, WU WX. Insight into the effects of biochar on manure composting: evidence supporting the relationship between N₂O emission and denitrifying community[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(13): 7341-7349.
- [36] LIERMANN W, LENA WISSING K, REYER H, TRAKOOLJUL N, DANNENBERGER D, TRÖSCHER A, HAMMON HM. Maternal conjugated linoleic acid supply in combination with or without essential fatty acids during late pregnancy and early lactation: investigations on physico-chemical characteristics of the jejunal content and jejunal microbiota in neonatal calves[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 839860.
- [37] XU ZJ, XIAO L, WANG SS, CHENG YQ, WU JP, MENG YF, BAO KF, ZHANG JF, CHENG C. Alteration of gastric microbiota and transcriptome in a rat with gastric intestinal metaplasia induced by deoxycholic acid[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1160821.
- [38] YIN J, LI YY, HAN H, CHEN S, GAO J, LIU G, WU X, DENG JP, YU QF, HUANG XG, FANG RJ, LI TJ, REITER RJ, ZHANG D, ZHU CR, ZHU GQ, REN WK, YIN YL. Melatonin reprogramming of gut microbiota improves lipid dysmetabolism in high-fat diet-fed mice[J]. *Journal of Pineal Research*, 2018, 65(4): e12524.
- [39] WANG MM, WICHENCHOT S, HE XW, FU X, HUANG Q, ZHANG B. *In vitro* colonic fermentation of dietary fibers: fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 88: 1-9.
- [40] SECOMBE KR, BALL IA, WIGNALL AD, BATEMAN E, KEEFE DM, BOWEN JM. Antibiotic treatment targeting Gram negative bacteria prevents neratinib-induced diarrhea in rats[J]. *Neoplasia*, 2022, 30: 100806.
- [41] JIANG Q. Metabolism of natural forms of vitamin E and biological actions of vitamin E metabolites[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2022, 179: 375-387.
- [42] QIU XJ, QIN XL, CHEN LM, CHEN ZM, HAO RK, ZHANG SY, YANG SR, WANG LN, CUI YF, LI YQ, MA YH, CAO BH, SU HW. Serum biochemical parameters, rumen fermentation, and rumen Bacterial communities are partly driven by the breed and sex of cattle when fed high-grain diet[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 323.
- [43] AUFFRET MD, STEWART RD, DEWHURST RJ, DUTHIE CA, WATSON M, ROEHE R. Identification of microbial genetic capacities and potential mechanisms within the rumen microbiome explaining differences in beef cattle feed efficiency[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1229.
- [44] ZHANG J, SHI HT, WANG YC, LI SL, CAO ZJ, YANG HJ, WANG YJ. Carbohydrate and amino acid metabolism and oxidative status in Holstein heifers precision-fed diets with different forage to concentrate ratios[J]. *Animal*, 2020, 14(11): 2315-2325.
- [45] XU XW, OCANSEY DKW, HANG SH, WANG B, AMOAH S, YI CX, ZHANG X, LIU LQ, MAO F. The gut metagenomics and metabolomics signature in patients with inflammatory bowel disease[J]. *Gut Pathogens*, 2022, 14(1): 26.
- [46] 常文露, 马爱国, 孙永叶, 汪求真, 蔡静, 毛蕊, 李承坤. 维生素 E 与镁对肥胖大鼠糖脂代谢影响的研究[J]. *卫生研究*, 2014, 43(5): 713-718.
- CHANG WL, MA AG, SUN YY, WANG QZ, CAI J, MAO R, LI CK. Effects of vitamin E and magnesium on glucose and lipid metabolism in obese rats[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2014, 43(5): 713-718 (in Chinese).
- [47] SHEN XH, TANG QY, WU J, FENG Y, HUANG J, CAI W. Effect of vitamin E supplementation on oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity[J]. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 2009, 79(4): 255-263.
- [48] HUANG CY, PAI YC, YU L. Glucose-mediated cytoprotection in the gut epithelium under ischemic and hypoxic stress[J]. *Histology and Histopathology*, 2016, 32(6): 543-550.