



## 研究报告

## 太子参内生细菌 RPB-32 的分类鉴定及其代谢物对小鼠肠道微生物群落的影响

王俊丽 欧阳湖 谢虹雅 苏松 焦松林 陈子涵 任建国\*

贵州医科大学公共卫生学院 环境污染与疾病监控教育部重点实验室 贵州 贵阳 550025

**摘要:**【背景】肠道微生物在宿主肠道微环境稳态中起着至关重要的作用。众多因子,如抗生素、饮食和年龄等会干扰这种微平衡,引起菌群平衡发生改变,进而影响到机体健康状况。太子参具有心肌保护、增加免疫、抗氧化、抗糖尿病、抗应激、抗疲劳等药理活性,而太子参内生菌代谢物对肠道微生物的调控作用以及可能对机体健康的影响目前还未见报道。【目的】研究太子参内生菌 RPB-32 分类地位及其代谢提取物对小鼠肠道微生物的调节作用,以探讨其对机体健康的影响。【方法】对 RPB-32 进行传统方法和分子鉴定。将 120 只 KM 小鼠随机分为溶剂对照组(3%乙醇)及石油醚提取物、正丁醇提取物和乙酸乙酯提取物低、中、高剂量组( $n=12$ )。小鼠灌胃处理 14 d 后采集粪便,通过选择性培养基培养及宏基因组测序[溶剂对照(S.F.1 为 3%乙醇溶液)、乙酸乙酯提取物高剂量组(S.F.2)]检测灌胃前后小鼠肠道微生物的变化。【结果】常规传统方法与分子鉴定结果表明 RPB-32 为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)。与空白对照组相比,给予内生菌代谢提取物的乙酸乙酯中剂量组、乙酸乙酯高剂量组、正丁醇低剂量组、正丁醇中剂量组及正丁醇高剂量组乳酸菌数量明显增加,正丁醇中剂量组的肠球菌和正丁醇高剂量组的肠杆菌数量明显减少。S.F.2 与 S.F.1 基于门、属和种水平上的微生物群落结构相比表明: S.F.2 的拟杆菌门(*Bacteroidetes*)数量明显增加,而厚壁菌门(*Firmicutes*)数量明显减少; S.F.2 的 *Bacteroides*、*Prevotella*、*Parabacteroides*、*Akkermansia*、*Helicobacter*、*Butyrivibrio*、*Alistipes*、*Ruminococcus*、*Muribaculum*、*Barnesiella*、*Odoribacter*、*Azospirillum*、*Mucispirillum* 和 *Lactobacillus* 数量明显增多, *Rikenella*、*Angelakisella*、*Clostridium*、*Oscillibacter*、*Pseudoflavonifractor*、*Flavonifractor*、*Mailhella*、*Desulfovibrio*、*Faecalibacterium*、*Eubacterium*、*Lachnoclostridium*、*Hungatella*、*Butyrivibrio*、*Blautia*、*Dorea*、*Ruminiclostridium*、*Roseburia*、*Anaerotruncus* 和 *Butyricoccus* 等数量减少; S.F.2 的 *Bacteroides sartorii*、*Bacteroides caecimuris*、*Bacteroides uniformis*、*Parabacteroides chinchillae*、*Parabacteroides glodsteinii*、*Helicobacter bilis*、*Bacteroides fragilis*、*Bacteroides vulgatus*、*Bacteroides thetaiotaomicron* 和 *Butyrivibrio virosa* 等数量明显增多, *Faecalibacterium prausnitzii*、*Rikenella microfus*、*Flavonifractor plautii*、*Mailhella massiliensis* 和 *Clostridium clostridioforme* 等数量减少。【结论】初步判断太子参内生芽孢杆菌 RPB-32

**Foundation items:** Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Guizhou Province in 2018 (2018520329); First-Class Discipline Construction Project in Guizhou Province ([2017] 85); National Natural Science Foundation of China (31760604)

\*Corresponding author: Tel: 86-851-88416193; E-mail: jianguren2002@126.com

Received: 01-03-2020; Accepted: 01-06-2020; Published online: 22-08-2020

基金项目: 贵州省 2018 年大学生创新创业训练计划(2018520329); 贵州省区域内一流学科建设项目(黔教科研发[2017] 85 号); 国家自然科学基金(31760604)

\*通信作者: Tel: 0851-88416193; E-mail: jianguren2002@126.com

收稿日期: 2020-03-01; 接受日期: 2020-06-01; 网络首发日期: 2020-08-22

代谢物(BM)对肠道微生物组成有明显影响,可能对机体糖脂降解、抗感染和抗炎等方面有改善作用。

关键词: 太子参, 内生菌 RPB-32, 芽孢杆菌, 分类鉴定, 小鼠肠道微生物, 群落

## Identification of endogenous bacteria RPB-32 of *Radix pseudostellariae* and its metabolites effect on intestinal microorganism community of mice

WANG Junli OUYANG Hu XIE Hongya SU Song JIAO Songlin CHEN Zihan  
REN Jianguo\*

Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education; School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China

**Abstract: [Background]** Intestinal microorganisms play a vital role in homeostasis of the host's intestinal microenvironment. Many factors, such as antibiotics, diet and age, can interfere with this microbalance, causing changes in the microflora balance, which in turn affects the health of the body. There exist many pharmacological activities such as myocardial protection, immunity improvement, anti-oxidation, anti-diabetes, anti-stress, and anti-fatigue on *Radix pseudostellariae*. However, the regulation effect of endophytic metabolites of *Radix pseudostellariae* on intestinal microbes and their possible impacts on body health have not been studied so far. **[Objective]** The taxonomic status of endophytic bacterium RPB-32 from *Radix pseudostellariae* and the regulation of its metabolic extracts on the intestinal microbes of mice were studied to explore its impact on body health. **[Methods]** Strain RPB-32 was identified based on the traditional and molecular methods. 120 KM mice were randomly divided into four groups, viz. solvent control group (3% ethanol), the low, medium and high-dose groups of petroleum ether extract, ethyl acetate extract and n-butanol extract ( $n=12$ ). After 14 days of intragastric treatments, the mice feces were collected aseptically, and the changes of intestinal microorganisms before and after intragastric gavage were detected by selective medium culture and metagenomic sequencing (solvent control (S.F.1), high-dose ethyl acetate extract group (S.F.2)). **[Results]** Strain RPB-32 was identified as *Bacillus* sp. according to the conventional and molecular methods. Compared with the blank control group, the amounts of lactic acid bacteria significantly increased in the tested groups of medium-dose ethyl acetate extracts, high-dose ethyl acetate extracts, low-dose n-butanol extracts, medium-dose n-butanol extracts and high-dose n-butanol extracts, while the amounts of *Enterococcus* and *Enterobacter* in the groups of middle-dose n-butanol extracts and high-dose n-butanol extracts were significantly reduced, respectively. The comparison of the microbial community structure showed that the amount of *Firmicutes* obviously reduced, but that of *Bacteroidetes* significantly increased in S.F.2 collated with S.F.1 at the phylum level; the amounts of *Bacteroides*, *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Akkermansia*, *Helicobacter*, *Butyricimonas*, *Alistipes*, *Ruminococcus*, *Muribaculum*, *Barnesiella*, *Odoribacter*, *Azospirillum*, *Mucispirillum*, *Lactobacillus* obviously increased, while those of *Rikenella*, *Angelakisella*, *Clostridium*, *Oscillibacter*, *Pseudoflavonifractor*, *Flavonifractor*, *Mailhella*, *Desulfovibrio*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Lachnoclostridium*, *Hungatella*, *Butyrivibrio*, *Blautia*, *Dorea*, *Ruminiclostridium*, *Roseburia*, *Anaerotruncus*, *Butyricicoccus* significantly decreased in S.F.2 contrasted with S.F.1 at the genus level; the amounts of *Bacteroides sartorii*, *Bacteroides caecimuris*, *Bacteroides uniformis*, *Parabacteroides chinchillae*, *Parabacteroides glodsteinii*, *Helicobacter bilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Butyricimonas virosa* strikingly increased, while those of *Faecalibacterium prausnitzii*, *Rikenella microfusum*, *Flavonifractor plautii*, *Mailhella massiliensis*, *Clostridium clostridioforme* significantly decreased in S.F.2 in comparison with S.F.1 at the species level. **[Conclusion]**

It was preliminarily determined that the metabolites of endophytic *Bacillus* sp. RPB-32 (BM) from *Radix pseudostellariae* had the significant effects on the composition of intestinal microorganisms in mice, and might improve the degradation of glucose and lipid, anti-infective and anti-inflammatory activities in body.

**Keywords:** *Radix pseudostellariae*, endogenous bacteria RPB-32, *bacillus*, taxonomy and identification, mice intestinal microorganism, community

肠道微生物数目众多、种类丰富,其与宿主互利共生,影响着宿主健康。正常生理情况下,人体肠道菌群是以一定的数量和比例存在于肠道中,起着营养代谢、生物拮抗、免疫调节、促生长、抗肿瘤和防衰老等积极作用。服用抗生素或改变膳食结构等均会导致肠道微生物组成和功能的变化,进而影响到宿主的健康状况。抗生素对肠道微生物的不利影响表现有短期效应和长期效应;短期效应包括腹泻、*Clostridium difficile* 感染、耐抗生素微生物的选择<sup>[1-3]</sup>,长期效应包括过敏<sup>[4]</sup>和肥胖<sup>[5]</sup>。膳食是塑造肠道菌群不可或缺的因素。肥胖人群由高脂饮食转变为低脂、低碳水化合物饮食时,随着体质量的下降,肠道菌群结构也发生变化,拟杆菌门(*Bacteroidetes*)数量增加、厚壁菌门(*Firmicutes*)数量减少,而且两者的数量比例逐渐接近健康人群<sup>[6]</sup>。De Filippo 等<sup>[7]</sup>的研究表明素食者与杂食者肠道菌群差异显著,素食者肠道中 *Prevotella*、*Treponema* 和 *Xylanibacter* 等丰度较高, *Shigella* 和 *Escherichia* (条件致病菌)丰度较低,而杂食者肠道菌群中 *Acetivomaculum* 和 *Faecalibacterium* 等丰度较高,进而说明了饮食结构会对肠道菌群和与之相关机体的健康状况产生影响。

传统中草药在我国预防和治疗疾病已有几千年历史,其给药途径以口服为主。药物中的有效成分进入胃肠道后与肠道菌群相互作用,进而发挥药理作用<sup>[8]</sup>。Xu 等<sup>[9]</sup>研究表明,葛根芩连汤能够增加病人肠道有益菌 *Faecalibacterium* spp.而使糖尿病病情得到缓解。Wang 等<sup>[10]</sup>在鼠结肠癌模型试验中发现,西洋参提取物(15 mg/kg 和 30 mg/kg)可以显著降低结肠癌小鼠的肿瘤数目及大小,同时机体促炎性细胞因子 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6 表达下调;

西洋参提取物的这种抗肿瘤作用与其增加了肠道中拟杆菌门(*Firmicutes*)细菌、并降低了 *Bacteroidales* 及 *Verrucomicrobia* 有关。

太子参(*Pseudostellaria heterophylla*)是石竹科多年生草本植物,其块根具有健脾、益气血、润肺、止咳、抗 HIV 感染、抗糖尿病和抗氧化等功效。随着临床需求量增加以及太子参功能性食品的开发,其市场需求量逐年增加。但由于太子参种植生产受环境和季节等的影响,所以其产量往往不能满足人们的需要,进一步开发利用太子参迫在眉睫。植物内生菌能够产生多种与宿主植物相似或相同具有药用价值的生物活性物质(植物内生菌次生代谢产物),这给本研究提供了思路。因此,本文研究太子参内生菌代谢物对小鼠肠道微生物的影响,进而分析其对有机体生理功能的可能影响,以期太子参内生菌代谢物在临床应用方面提供科学参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

太子参内生细菌 RPB-32 为课题组前期从太子参块根分离保存的菌株。

无特殊病菌 KM 小鼠 120 只,雌雄各半,体质量 18–22 g,购买于贵州医科大学动物实验中心,自由进食普通标准饲料和饮用纯净水,在温度为 25 $\pm$ 1 °C 空调动物房适应性饲养 7 d 后开始试验。

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,琼脂 15.0,用于菌株活化培养;营养肉汤培养液(g/L): 蛋白胨 10.0,牛肉浸膏 3.0,氯化钠 5.0, pH 7.2,用于菌株发酵培养;乳酸菌选择性培养基(MRS)、伊红美兰培养基(EMB)、胆汁七叶苷叠氮钠琼脂购自青岛高科园海博生物技术有限公司,分别用于乳酸菌、肠杆菌和肠球菌选择性培养。

石油醚、乙酸乙酯、正丁醇,天津市科密欧化学试剂有限公司。旋转蒸发仪, BUCHI 公司; 水浴恒温振荡器, 常州金坛良友仪器有限公司; 微孔滤膜, 天津津腾试验设备有限公司; 循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 内生菌 RPB-32 的分离及纯化

取新鲜的太子参块根, 先用自来水冲洗干净, 然后置于室温晾干。依次用 70% 酒精浸泡 30 s, 5%  $\text{NaClO}_4$  浸泡 5 min, 再用无菌水冲洗 5 遍, 取最后一遍冲洗的无菌水 0.1 mL 涂布在 PDA 培养基上, 设置 3 个重复, 28 °C 恒温培养 24 h 观察其是否有菌落出现, 未见有菌落出现则说明块根组织表面灭菌彻底。

将经过表面灭菌的块根用解剖刀切割成 0.5 cm×0.5 cm 见方的小块, 放置于 PDA 平板上, 每皿均匀放置 3 块, 28 °C 恒温倒置培养。每隔 12 h 观察一次, 待块根切口处长出菌落后, 用接种环挑取菌落转移到 PDA 平板上进行平板划线法纯化, 将得到的单菌落转接 PDA 斜面培养基上保存备用。

### 1.2.2 内生菌 RPB-32 的分类鉴定

将课题组前期获得的太子参内生菌菌株 RPB-32 用平板划线法接种在 PDA 培养基上, 置于隔水式恒温培养箱中 28 °C 培养 24 h。再选取单个菌落重复以上步骤 2 次获得纯化的菌种, 进行传统分类鉴定和分子鉴定。菌株 RPB-32 传统分类鉴定参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[11]</sup>和《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[12]</sup>。试验内容包括: 菌落培养特征、菌体形态和生理生化试验(包括碳源利用、淀粉水解实验、接触酶、糖发酵实验等)。分子鉴定采用 DNA 提取试剂盒提取 RPB-32 基因组, 选择引物 27F (5'-AGAGTITGATCCTGGCTCAG-3')和 1495R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 16S rRNA 基因扩增<sup>[13]</sup>, 将未纯化回收的 PCR 扩增产物委托贵阳 NEST 生物技术公司(金斯瑞分公司)测序, 测定结果通过 NCBI 网站 BLAST 程序搜寻近缘物种, 结合细菌传统分类鉴定结果, 确定可培养细菌的

属种。

### 1.2.3 内生菌 RPB-32 发酵培养及代谢物的提取

取纯化后的 RPB-32 接种于装有 1 mL 无菌水的 EP 管中振摇均匀, 制备成菌悬液, 吸取 10  $\mu\text{L}$  菌悬液至装有 400 mL 肉汤培养液的三角瓶中, 28 °C、140 r/min 摇床振荡培养 5 d 得到发酵液, 重复 50 瓶。将发酵液经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜减压抽滤去掉菌体后, 依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取 3 次, 得到石油醚相、乙酸乙酯相和正丁醇相, 萃取液经减压脱溶得浸膏, 即为供试内生菌代谢产物的粗提物。置于 4 °C 冰箱保存备用。

### 1.2.4 小鼠分组、给药和取样

将 120 只无特殊病菌 KM 小鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为 10 组。10 组小鼠分别为: 溶剂对照组(3%乙醇); 石油醚提取物低、中、高浓度组(0.025、0.075、0.225 g/mL); 乙酸乙酯提取物低、中、高浓度组(0.033、0.099、0.297 g/mL); 正丁醇提取物低、中、高浓度组(0.067、0.201、0.603 g/mL)。实验前小鼠禁食不禁水 12 h, 采集粪便置于无菌 EP 管内-80 °C 保存, 用于给药前肠道微生物分析。每日上午 9:00 进行内生菌代谢提取物灌胃 1 次, 灌胃量按 0.1 mL/10 g 体重, 各组小鼠每日的基础饲料种类和质量相同, 连续给药 14 d。第 14 天末次给予提取物 24 h 后无菌采取各处理组小鼠粪便, 置于无菌 EP 管内-80 °C 保存, 用于给药后肠道微生物分析。

### 1.2.5 肠道菌群的检测

肠道菌群的选择性培养分析采用陈琛等的方法<sup>[14]</sup>。将采集的小鼠(雌、雄)粪便置于灭菌的硫酸纸上称重后放入带玻璃珠的无菌小试管中, 加生理盐水, 以 1:50 稀释制成均匀悬液, 再依次以 10 倍比梯度稀释成一系列不同稀释度的含菌液, 根据预实验的结果, 分别取 10  $\mu\text{L}$   $2\times 10^4$ 、 $2\times 10^5$  稀释度的含菌液于乳酸菌选择性培养基(MRS)、伊红美兰培养基(EMB)、胆汁七叶苷叠氮琼脂上, 用涂布棒均匀涂布后培养。每个稀释度 2 个重复, 按照各培养基的培养要求进行培养, 待菌落长出后, 计数各种培养基菌落数, 并对 3 种肠道菌(乳酸菌、肠杆菌、

肠球菌)进行菌群分析,以每克粪便中菌落的对数表示(lg CFU/g)。

### 1.2.6 肠道微生物宏基因组分析

根据内生菌 RPB-32 代谢物对小鼠血液生化指标的影响结果,选择乙酸乙酯高剂量组(实验组-S.F.2)及其溶剂对照组(对照组-S.F.1)粪便样本进行肠道微生物宏基因组分析。每组设置 12 只 KM 小鼠。22 d 饲养处理后,每组随机收集 3 只 KM 小鼠 24 h 内的粪便样本进行分析。试验流程为粪便基因组 DNA 提取和检测、文库构建(加接头)、文库检测(Agilent 2100/Q-PCR)、上机测序(Illumina PE150)、下机质控[去除接头引物、去除低质量短读码框(Reads)和去除宿主序列]和生物信息分析(物种注释及物种丰度分析)。测序原始数据经过质控得到的“Clean Data”,通过 MEGAHIT 组装软件进行组装分析,将个体组装与混合组装所得到的“Scaffolds”从 N 连接处打断,得到不含 N 的序列片段“Scaffigs”。过滤掉 500 bp 以下的片段后对个体组装与混合组装基因片段(Scaffigs)进行基因预测去冗余后获得初始“Gene Catalogue”,将各样本 Clean Data 比对至去冗余后的代表性基因上,计算得到基因在各样本中比对上的 Reads 数目,从比对上的 Reads 数目及基因长度出发,计算得到各基因在各样本中的丰度信息。某个物种在某个样本中的丰度等于注释为该物种的基因丰度的加和。该部分试验工作由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。组间差异物种分析采用 *t* 检验和 LEfSe 法。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生菌 RPB-32 的鉴定

RPB-32 菌株在 PDA 平板上菌落为乳白色,中央凸起并有皱褶,边缘整齐,中等大小,菌体短杆状,革兰氏染色呈阳性。菌株生理生化测试结果为:接触酶、尿素水解、V-P、产氨、色氨酸脱氨酶、氧化酶、七叶苷和果糖利用试验为阳性;碳源利用、吲哚产生、3-酮基乳糖试验、硝酸盐还原、H<sub>2</sub>S 产生、丙二酸盐利用、明胶液化、苯丙氨酸脱氨酶、

淀粉水解及卫矛醇、枸橼酸盐、甘露糖、鼠李糖、乳糖、麦芽糖、阿拉伯糖、血清菊糖、糊精、木糖和山梨醇利用试验为阴性。根据菌株 RPB-32 的形态特征和生理生化特征,初步鉴定该菌为芽孢杆菌属菌株。RPB-32 菌株 16S rRNA 基因测序结果(登录号 MT131172)进行 BLAST 序列同源性搜索,结果与 *Bacillus* sp. DZ-03-14-car (MK577362.1)、*Bacillus toyonensis* Cu48 (KY085984.1)和 *Bacillus albus* FS1 (MH475941.1)等菌株序列相似性均达 97%,而且参考文献[11-12]确定太子参内生菌 RPB-32 为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)。

### 2.2 肠道微生物选择性培养结果

对给予内生菌代谢提取物前后的小鼠粪便中培养得到的乳酸菌(Lactic Acid Bacteria)、肠杆菌(*Enterobacter*)和肠球菌(*Enterococcus*)计数,结果如表 1 所示。经配对 *t* 检验得到乙酸乙酯中剂量组、乙酸乙酯高剂量组、正丁醇低剂量组、正丁醇中剂量组和正丁醇高剂量组乳酸菌数量增多,差异有统计学意义( $P<0.05$ );正丁醇中剂量组肠杆菌(*Enterobacter*)数量减少,差异有统计学意义( $P<0.05$ );正丁醇高剂量组肠球菌(*Enterococcus*)数量减少,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 2.3 肠道微生物宏基因组测序结果

#### (1) 受试组(S.F.2)与对照组(S.F.1)组间差异分析

基于物种门水平的主成分分析(Principal Components Analysis, PCA)和相似性分析(Analysis of Similarities, Anosim)(图 1,图 2),主成分 1(PC1)和主成分 2(PC2)是造成 2 组样品(S.F.1 和 S.F.2)差异明显的 2 个成分,PC1 的贡献率为 42.32%,PC2 的贡献率为 21.79%。在 Anosim 分析中  $R=0.667$  大于 0,而且 Between 中位线高于实验组与对照组中位线,说明组间差异显著。

#### (2) 受试组(S.F.2)与对照组(S.F.1)肠道菌群多样性分析

基于门水平(Phylum Level)的相对丰度分析表明:两组样品均包含厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌

门(*Bacteroidetes*) 2 个主要的门, 同时还包括相对丰度较少的变形菌门(*Proteobacteria*)、衣原体菌门(*Chlamydiae*)和脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)等。比较两组样品的菌群组成可见, S.F.1 (对照组)样品中

厚壁菌门(*Firmicutes*)相对丰度为 58.3%, 拟杆菌门(*Bacteroidetes*)为 20.0%, 变形菌门(*Proteobacteria*)为 2.3%; 而 S.F.2 (实验组)厚壁菌门(*Firmicutes*)相对数量为 42.3%, 拟杆菌门(*Bacteroidetes*)为 34.0%, 变形

表 1 给予受试物前后小鼠肠道可培养微生物的数量变化

Table 1 The quantitative changes of cultural bacteria in the intestinal tract of mice before and after the administration of tested substances (lg CFU/g, X±SD, n=12)

组别 Groups	乳酸菌 Lactic acid bacteria		肠球菌 <i>Enterococcus</i>		肠杆菌 <i>Enterobacter</i>	
	Before	After	Before	After	Before	After
溶剂对照组 Solvent control group	9.08±0.31	9.08±0.328	8.62±0.30	8.72±0.18	9.06±0.22	9.03±0.15
石油醚低剂量组 Low-dose group of petroleum ether extract	9.20±0.18	9.22±0.18	8.59±0.34	8.56±0.40	8.95±0.11	8.96±0.21
石油醚中剂量组 Medium-dose group of petroleum ether extract	9.08±0.32	9.11±0.027	8.69±0.26	8.69±0.28	9.00±0.25	8.91±0.31
石油醚高剂量组 High-dose group of petroleum ether extract	9.03±0.17	9.41±0.10	8.64±0.35	8.52±0.25	8.92±0.24	8.67±0.14
乙酸乙酯低剂量组 Low-dose group of ethyl acetate extract	9.18±0.13	9.21±0.15	8.53±0.41	8.50±0.46	9.05±0.20	9.07±0.18
乙酸乙酯中剂量组 Medium-dose group of ethyl acetate extract	9.05±0.10	9.42±0.05*	8.75±0.21	8.55±0.49	8.91±0.19	8.83±0.16
乙酸乙酯高剂量组 High-dose group of ethyl acetate extract	9.00±0.08	9.40±0.09*	8.47±0.30	8.31±0.25	8.96±0.14	8.79±0.22
正丁醇低剂量组 Low-dose group of n-butanol extracts	9.18±0.13	9.35±0.10*	8.65±0.29	8.47±0.36	9.00±0.23	8.85±0.16
正丁醇中剂量组 Medium-dose group of n-butanol extracts	8.94±0.15	9.42±0.08*	8.67±0.28	8.47±0.36*	8.90±0.16	8.37±0.29
正丁醇高剂量组 High-dose group of n-butanol extracts	9.09±0.09	9.36±0.04*	8.68±0.39	8.16±0.46	8.85±0.13	8.41±0.34*

注: \*表示同一处理给予受试物前后微生物数量有差异  $P<0.05$   
Note: \* meant the differences on the number of microorganisms existed before and after the same treatment  $P<0.05$

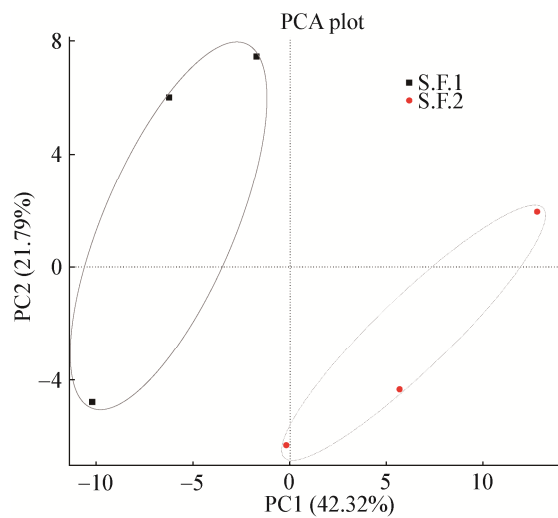


图 1 基于门水平的主成分分析  
Figure 1 Principal component analysis (PCA) based on phylum level

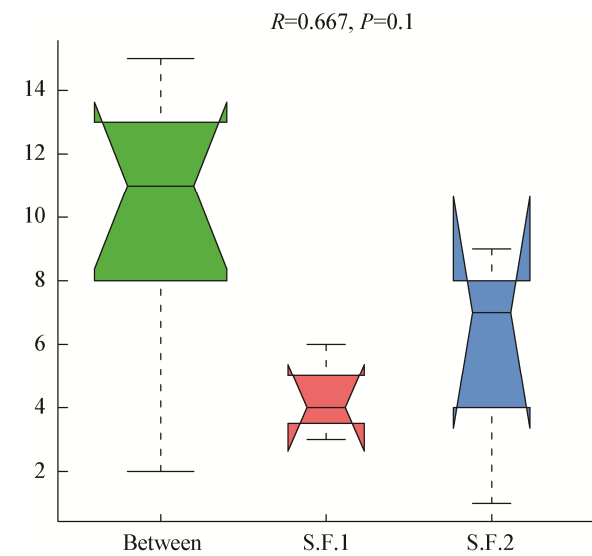


图 2 基于门水平的 Anosim 分析  
Figure 2 Anosim analysis based on phylum level

菌门(*Proteobacteria*)为 3.3%。由此可见, 实验组(S.F.2)小鼠肠道微生物中厚壁菌门(*Firmicutes*)较对照组减少, 拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和变形菌门(*Proteobacteria*)则相反(图 3)。

基于属水平(Genus Level)的相对丰度分析表明: 两组样品均包含拟杆菌属(*Bacteroides*)、产气荚膜杆菌属(*Clostridium*)、普氏菌属(*Prevotella*)和衣原体属(*Chlamydia*)等, 但其组成有所不同。 $t$  检验表明: 与样品 S.F.1 相比较, 样品 S.F.2 中 *Oscillibacter* 丰度明显减少(-1.2%); 而拟杆菌属(*Bacteroides*)和 *Prevotella* 丰度显著增加(+4.4%和+1.8%) (图 4)。S.F.1 样品中拟杆菌属(*Bacteroides*)含量为 6.7%, 普

氏杆菌属(*Prevotella*)含量为 2.0%, S.F.2 拟杆菌属(*Bacteroides*)含量为 11.0%, 普氏杆菌属(*Prevotella*)含量为 3.7%, 实验组(S.F.2) *Prevotella*-to-*Bacteroides* ( $P/B$ )值(0.34)大于对照组(0.30)。由此可见, 乙酸乙酯提取物高剂量组(S.F.2)有降低“肥菌”*Oscillibacter* 数量和提高 *Prevotella*-to-*Bacteroides* 系数的作用。

(3) 受试组(S.F.2)与对照组(S.F.1)间菌群差异分析

与 S.F.1 相比, 在门水平上, S.F.2 的拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、疣微菌门(*Verrucomicrob*)和铁还原杆菌门(*Deferribactere*)丰度增加, 厚壁菌门(*Firmicutes*)丰度降低; 在目水平上, S.F.2 的拟杆菌

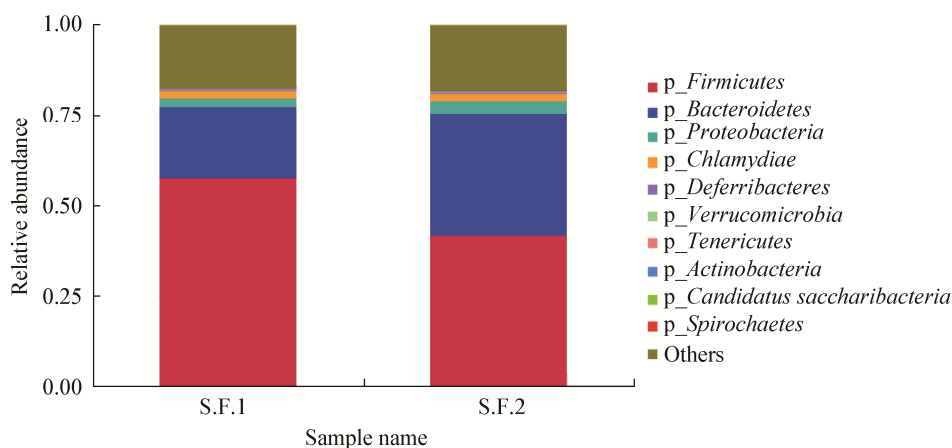


图 3 基于门水平的肠道菌群相对丰度柱形图

Figure 3 The bar chart of relative abundance of intestinal flora at phylum level

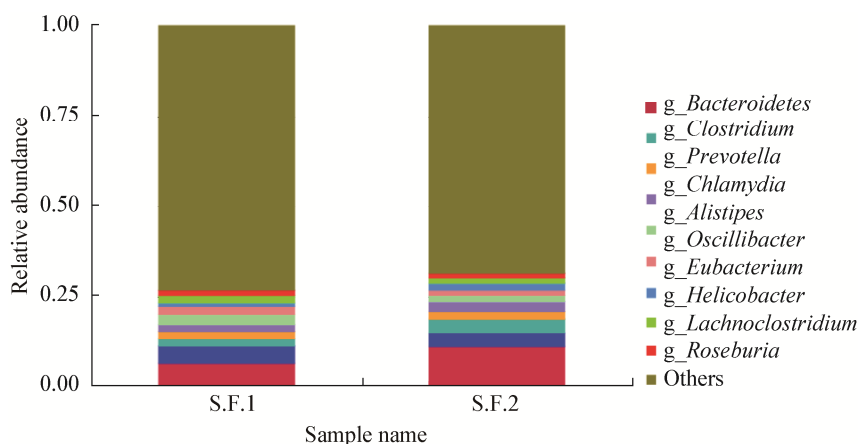


图 4 基于属水平的肠道菌群相对丰度柱形图

Figure 4 The bar chart of relative abundance of intestinal flora at genus level

目 (*Bacteroidales*) 丰富增加, 丹毒丝菌目 (*Erysipelotrichales*) 丰度降低; 在科水平上, S.F.2 的 *Akkermansiaceae* 丰度增加, 而毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*) 和瘤胃菌科 (*Ruminococcaceae*) 丰度降低; 在属水平上, S.F.2 的 *Bacteroides*、*Prevotella*、*Parabacteroides*、*Akkermansia*、*Helicobacter*、*Butyricimonas*、*Alistipes*、*Ruminococcus*、*Muribaculum*、*Barnesiella*、

*Odoribacter*、*Azospirillum*、*Mucispirillum* 和 *Lactobacillus* 丰度增加, 而 *Rikenella*、*Angelakisella*、*Clostridium*、*Oscillibacter*、*Pseudoflavonifractor*、*Flavonifractor*、*Mailhella*、*Desulfovibrio*、*Faecalibacterium*、*Eubacterium*、*Lachnoclostridium*、*Hungatella*、*Butyrivibrio*、*Blautia*、*Dorea*、*Ruminiclostridium*、*Roseburia*、*Anaerotruncus* 和 *Butyricicoccus* 等一些属细菌丰度降低(图 5 和 6A)。

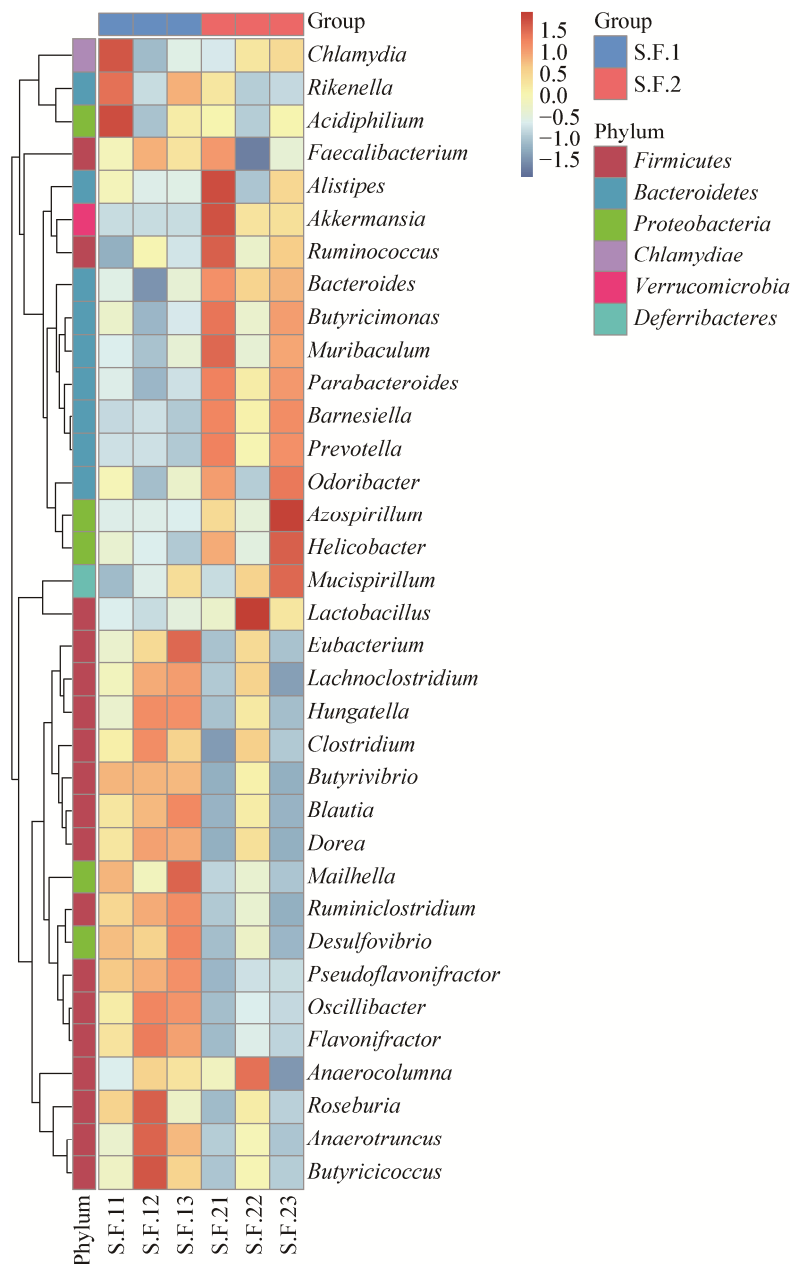
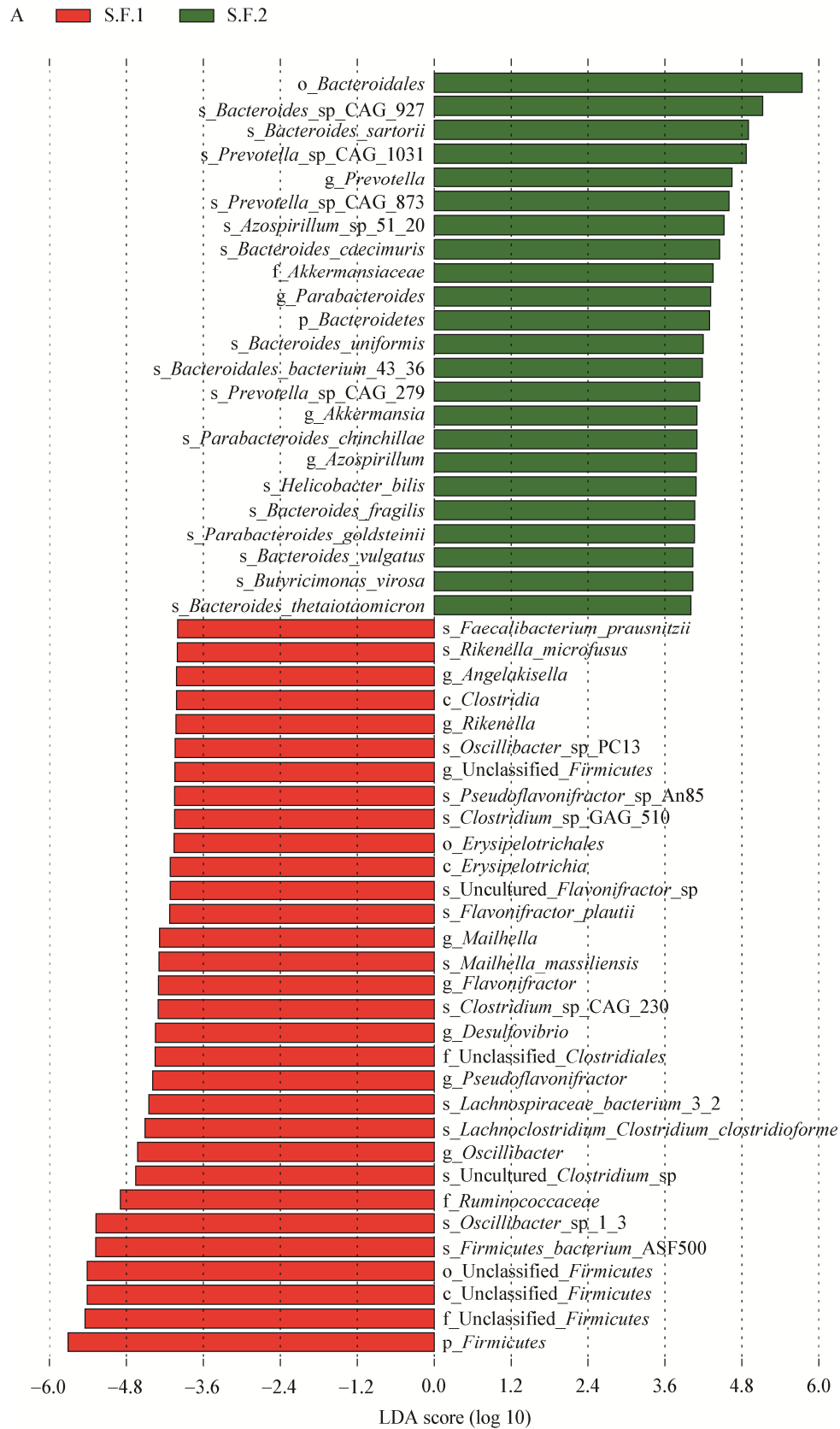


图 5 肠道菌群丰度聚类热图

Figure 5 The clustering heatmap of relative abundance of intestinal flora





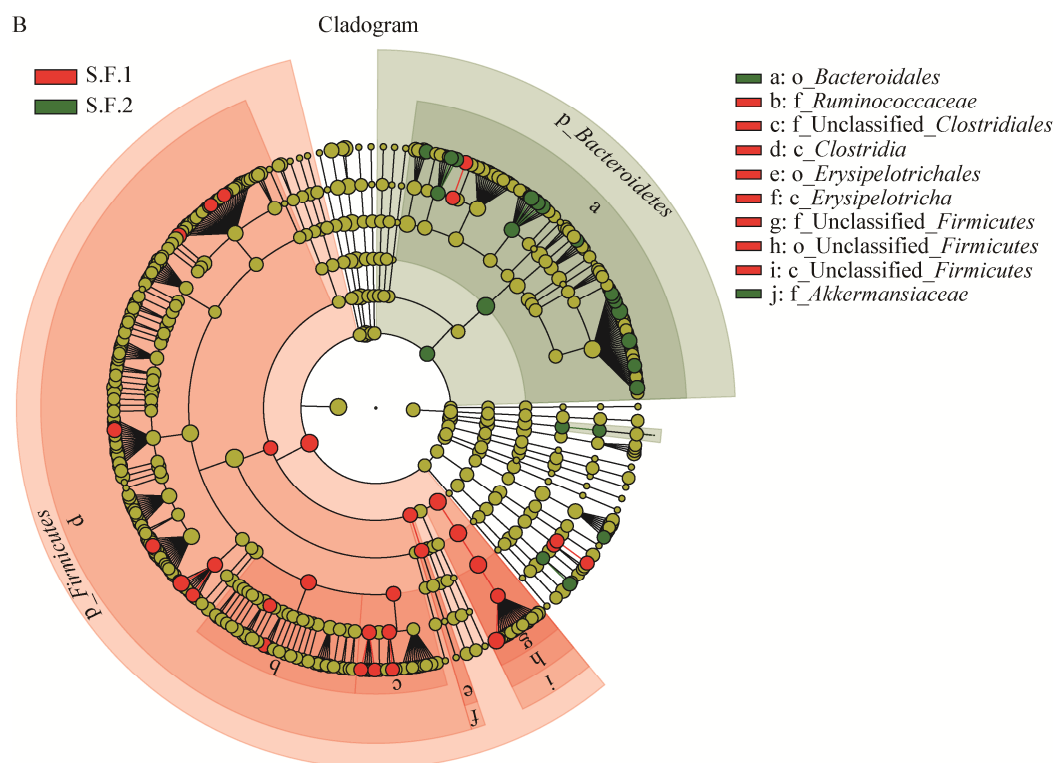


图 6 LefSe 差异分析图

Figure 6 The diagram of LefSe differential analysis

在种水平上, S.F.2 的 *Bacteroides sartorii*、*Bacteroides caecimuris*、*Bacteroides uniformis*、*Parabacteroides chinchillae*、*Parabacteroides glodsteinii*、*Helicobacter bilis*、*Bacteroides fragilis*、*Bacteroides vulgatus*、*Bacteroides thetaiotaomicron* 和 *Butyrivibrio virosa* 等数量明显增多, *Faecalibacterium prausnitzii*、*Rikenella microfus*、*Flavonifractor plautii*、*Maihella massiliensis* 和 *Clostridium clostridioforme* 等数量减少(图 6A)。图 6B 为进化分支图, 其中以不同颜色显示了 2 组 S.F.1 (红色)和 S.F.2 (绿色)间生物标志物的丰度差异。红色和绿色节点分别为在 S.F.1 和 S.F.2 处理组中起重要作用的肠道菌群类型。由此可见, 内生菌 RPB-32 乙酸乙酯高剂量组(实验组)对小鼠肠道菌群组成结构有重大影响。

### 3 讨论

#### 3.1 芽孢杆菌代谢物对肠道常见微生物的调控作用

太子参内生菌 RPB-32 经过传统分类鉴定和分

子鉴定确定为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)。芽孢杆菌具有丰富的代谢产物, 如细菌素、脂肽、嗜铁素、生物碱、黄酮类化合物等<sup>[15]</sup>, 目前尚未发现有关中药材内生菌代谢产物对肠道微生物影响的相关报道。鉴于此, 本试验应用太子参内生芽孢杆菌 *Bacillus* sp. RPB-32 代谢物(BM)进行小鼠灌胃试验: 选择性培养基培养试验结果显示, 乙酸乙酯提取物中剂量组、乙酸乙酯提取物高剂量组、正丁醇提取物低剂量组、正丁醇提取物中剂量组、正丁醇提取物高剂量组均能使乳酸菌数量增多; 正丁醇提取物中剂量组能使肠球菌(*Enterococcus*)数量减少; 正丁醇提取物高剂量组能使肠杆菌(*Enterobacter*)数量减少。肠杆菌(*Enterobacter*)和肠球菌(*Enterococcus*)是重要的条件致病菌, 而乳酸菌<sup>[16]</sup>和乳杆菌(*Lactobacillus*)<sup>[17]</sup>是对机体健康有众多益处的益生菌, 从 BM 灌胃作用下肠道益生菌——乳酸菌和乳杆菌及条件致病菌肠杆菌和肠球菌数量的变化, 进而说明了该内生菌次生代谢物对机体健康的多方

面保护作用。

### 3.2 芽孢杆菌代谢物通过肠道微生物的作用可能影响宿主脂代谢

本研究中经 BM 灌胃处理的鼠肠道拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 数量明显增加, 而厚壁菌门 (*Firmicutes*) 数量明显减少, 结合 Ismail 等<sup>[18]</sup>的研究结果, 即 *Firmicutes* 与 *Bacteroidetes* 比例的增大与肥胖症发生有关, 进而说明内生菌代谢物可能通过肠道微生物的作用起到减肥消脂的功效。 *Prevotella* 与富含植物纤维的饮食相关, 研究已证实高 *Prevotella/Bacteroides* 的人以高纤维为饮食时比低 *Prevotella/Bacteroides* 的人更容易减掉机体脂肪<sup>[19]</sup>。本研究结果中, BM 灌胃处理组比对照组的 *Prevotella/Bacteroides* 值高, 进而说明内生菌次生代谢物可能有促进机体减脂的作用。众多研究表明, 肠道 *Rikenella*<sup>[20]</sup>、*Oscillibacter*<sup>[21]</sup>、*Hungatella*<sup>[22]</sup>、*Butyrivibrio*<sup>[23]</sup>、*Ruminiclostridium*、*Roseburia* 和 *Anaerotruncus*<sup>[24]</sup>、*Lachnoclostridium* 和 *Blautia*<sup>[25]</sup> 的数量与宿主肥胖正相关, 而 *Odoribacter*<sup>[26]</sup>、*Parabacteroides* (*Parabacteroides goldsteinii*)<sup>[27-28]</sup>、*Bacteroides*、*Parabacteroides*、*Akkermansia* 和 *Alistipes*<sup>[24]</sup> 数量与宿主肥胖负相关。本研究中, BM 灌胃处理后 *Odoribacter*、*Bacteroides*、*Parabacteroides*、*Akkermansia*、*Alistipes* 和 *Parabacteroides* (*Parabacteroides goldsteinii*) 数量增加, 而 *Rikenella*、*Oscillibacter*、*Hungatella*、*Butyrivibrio*、*Ruminiclostridium*、*Roseburia*、*Anaerotruncus*、*Lachnoclostridium* 和 *Blautia* 等数量减少, 进而暗示了内生菌次生代谢物可能通过对肠道多个属种微生物的调节作用起到降脂作用。

### 3.3 芽孢杆菌代谢物通过肠道微生物的作用可能影响宿主糖代谢

*Bacteroides* 是肠道微生物的主要成员, 通过对复杂多糖的消化和产生有益机体健康的后生元而发挥有利宿主的作用(提供能源, T 细胞依赖免疫反应和限制肠道病原菌定殖等)<sup>[29]</sup>, 其中 *Bacteroides thetaiotaomicron*、*Bacteroides uniformis*、*Bacteroides*

*fragilis* 和 *Bacteroides vulgatus* 与宿主难利用糖的分解密切相关<sup>[30]</sup>, 而 *Bacteroides sartorii* 和 *Bacteroides caecimuris* 与机体特定食物的食用有关<sup>[31-32]</sup>。本研究中经 BM 灌胃处理后, 肠道 *Bacteroides* 及 *B. sartorii*、*B. caecimuris*、*B. uniformis*、*B. fragilis*、*B. vulgatus* 和 *B. thetaiotaomicron* 数量均增加, 进而表明内生菌次生代谢物可能促进机体对宿主难利用多糖的利用。已有报道表明 *Ruminococcus* 大多来自草食和杂食动物<sup>[33]</sup>, 而本研究表明其也可来自啮齿动物——小鼠, BM 灌胃处理后 *Ruminococcus* 数量增加, 并结合 *Ruminococcus* 对宿主摄入膳食多糖的转化作用<sup>[33-34]</sup>, 进而表明内生菌次生代谢物可能对机体膳食结构产生影响。健康鼠肠道宏基因组和宏转录组分析表明, 碳水化合物代谢在 *Muribaculum* 内是高表达的<sup>[35]</sup>。本研究的结果表明 BM 灌胃处理后 *Muribaculum* 数量增加, 可能预示着 *Muribaculum* 对机体内碳水化合物利用的增强。综上所述, 内生菌次生代谢物可能通过对肠道 *Bacteroides*、*Ruminococcus* 和 *Muribaculum* 等的调节作用影响机体糖解方式。

### 3.4 芽孢杆菌代谢物通过肠道微生物的作用可能影响宿主抗炎和抗感染等作用

本研究中肠道产丁酸 *Butyricimonas* 数量的增多可能意味着内生菌次生代谢物在机体多发性硬化中的抗炎作用<sup>[36]</sup>, 以及保护机体肠道黏膜屏障、降低发炎水平、刺激胃肠运动、减低肝脂肪、胆固醇和甘油三酯浓度等作用<sup>[37]</sup>。 *Butyricicoccus* 是产短链脂肪酸——丁酸的肠道细菌, 其与宿主抗炎作用相关<sup>[38]</sup>。本研究中经 BM 灌胃处理后, 肠道微生物 *Butyricicoccus* 数量下降, 可能暗示了机体不存在 *Butyricicoccus* 介导的内生菌次生代谢物抗炎作用。 *Barnesiella* 是一种肠道有益菌, 可保护宿主免受 *Enterococcus* 病原菌侵袭<sup>[39]</sup>, 本研究结果显示肠道内 *Barnesiella* (增加) 和 *Enterococcus* (降低) 数量呈相反趋势, 或许说明了内生菌次生代谢物对机体抗感染的调节作用。 *Clostridium* (*Clostridium clostridioforme*) 为条件致病菌, BM 灌胃处理后, 该

属细菌数量下降,可能暗示了内生菌次生代谢物介导的抑菌作用。结直肠癌患者和健康受试者肠道微生物对比分析表明,患者肠道 *Pseudoflavonifractor*、*Flavonifractor* (*Flavonifractor plautii*) 和 *Desulfovibrio* 数量均高于健康受试者<sup>[40]</sup>。然而本研究结果发现经 BM 灌胃处理后,上述 3 属细菌数量均低于对照组,可能暗示了内生菌次生代谢物对结直肠癌发生的调控作用。综上所述,内生菌次生代谢物可能通过对肠道 *Butyricimonas* 和 *Barnesiella* 等的调节作用影响机体抗炎和抗感染作用。

### 3.5 芽孢杆菌代谢物通过肠道微生物的作用可能对宿主产生不利影响

*Mucispirillum* 是定殖在肠道黏液层可降解 Mucin 的细菌,肠道炎症期间其数量增加<sup>[41]</sup>。本研究结果显示经 BM 灌胃处理后肠道 *Mucispirillum* 数量增加,可能暗示了次生代谢物作用机体发生炎症的可能性。尽管本研究众多现象表现出内生菌次生代谢物对宿主健康有利的影响,但由于肠道微生物是处于一个相互作用的环境中,不同个体之间的作用结果会影响到宿主的健康状况。据 Baxter 等<sup>[42]</sup>报道, *Bacteroides*、*Parabacteroides*、*Alistipes* 和 *Akkermansia* 的数量与增加肿瘤负荷(结直肠癌)正相关,而 *Roseburia* 和 *Faecalibacterium* 的数量与减轻肿瘤负荷正相关。本文研究结果发现经内生菌次生代谢物处理后的肠道菌群 *Bacteroides*、*Parabacteroides*、*Alistipes* 和 *Akkermansia* 数量增加,而 *Roseburia* 和 *Faecalibacterium* 数量降低,由此可见内生菌次生代谢物或许有增加结直肠癌发生的风险。同时,本研究发现内生菌次生代谢物处理后肠道产丁酸 *Faecalibacterium prausnitzii* 数量下降,或许意味着内生菌代谢物对直肠诸多生理不利的影响,包括直肠上皮细胞能量供应、炎症、氧化状况、上皮细胞屏障调节和肠运动等<sup>[43]</sup>。内生菌 *Bacillus* sp. RPB-32 次生代谢物处理组肠道 *Helicobacter* (*Helicobacter bilis*) 数量增多,可能暗示了代谢物与机体肠癌发生的相关性<sup>[44]</sup>。产丁酸细菌 *Eubacterium*、*Clostridia*、*Roseburia* 等有预防结肠

疾病的作用<sup>[45-46]</sup>,这与其所产生短链脂肪酸的作用密不可分<sup>[47]</sup>。本研究结果发现经 BM 灌胃处理后上述 3 属细菌数量均降低,进而说明内生菌代谢物可能增加结肠疾病发生的风险。

## 4 结论

通过本文的研究,可以初步推断太子参内生菌 RPB-32 代谢物可能通过调节肠道微生物组成影响机体糖脂降解、抗炎和抗感染等方面。由于本研究中太子参内生菌 RPB-32 代谢物各有机相中化学成分种类和数量均未知,因此需要对有机相部分进行活性成分的分离和纯化,以获得其基本化学结构信息,为进一步开发利用太子参内生菌代谢物用于疾病治疗提供新药物。

## REFERENCES

- [1] De Lastours V, Fantin B. Resistance to fluoroquinolones in 2010: what are the consequences for prescriptions in intensive care units?[J]. *Réanimation*, 2010, 19(4): 347-353
- [2] Johanesen PA, Mackin KE, Hutton ML, Awad MM, Larcombe S, Amy JM, Lyras D. Disruption of the gut microbiome: *Clostridium difficile* infection and the threat of antibiotic resistance[J]. *Genes*, 2015, 6(4): 1347-1360
- [3] Leffler DA, Lamont JT. *Clostridium difficile* infection[J]. *New England Journal of Medicine*, 2015, 372(16): 1539-1548
- [4] Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation[J]. *Cell*, 2014, 157(1): 121-141
- [5] Cox LM, Blaser MJ. Antibiotics in early life and obesity[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2015, 11(3): 182-190
- [6] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1022-1023
- [7] De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Baptiste Poullet J, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(33): 14691-14696
- [8] Park EK, Shin J, Bae EA, Lee YC, Kim DH. Intestinal bacteria activate estrogenic effect of main constituents puerarin and daidzin of *Pueraria thunbergiana*[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29(12): 2432-2435
- [9] Xu J, Lian FM, Zhao LH, Zhao YF, Chen XY, Zhang X, Guo Y, Zhang CH, Zhou Q, Xue ZS, et al. Structural modulation

- of gut microbiota during alleviation of type 2 diabetes with a Chinese herbal formula[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(3): 552-562
- [10] Wang CZ, Yu CH, Wen XD, Chen LN, Zhang CF, Calway T, Qiu YP, Wang YW, Zhang ZY, Anderson S, et al. American ginseng attenuates colitis-associated colon carcinogenesis in mice: impact on gut microbiota and metabolomics[J]. *Cancer Prevention Research*, 2016, 9(10): 803-811
- [11] Dong XZ, Cai MY. *Manual for Systematic Identification of Common Bacteria*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 364-398 (in Chinese)  
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-398
- [12] Buchanan RE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. Beijing: Science Press, 1984: 274-287 (in Chinese)  
布坎南 RE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 274-287
- [13] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703
- [14] Chen C, Jiang ZY, Song KY, Shi SS, Yan QC, Wu S, Sun YF. The effect of Chinese herbal medicine on mouse intestinal flora[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(1): 15-17 (in Chinese)  
陈琛, 江振友, 宋克玉, 施珊珊, 严群超, 吴莎, 孙毅凡. 中草药对小鼠肠道菌群影响的实验研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(1): 15-17
- [15] Ortiz A, Sansinenea E. Chemical compounds produced by *Bacillus* sp. factories and their role in nature[J]. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2019, 19(5): 373-380
- [16] Samedí L, Charles AL. Evaluation of technological and probiotic abilities of local lactic acid bacteria[J]. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2019, 7(1): 9-19
- [17] Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 84(3): 197-215
- [18] Ismail NA, Ragab SH, Elbaky AA, Shoeib ARS, Alhosary Y, Fekry D. Frequency of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults[J]. *Archives of Medical Science*, 2011, 7(3): 501-507
- [19] Hjorth MF, Roager HM, Larsen TM, Poulsen SK, Licht TR, Bahl MI, Zohar Y, Astrup A. Pre-treatment microbial *Prevotella*-to-*Bacteroides* ratio, determines body fat loss success during a 6-month randomized controlled diet intervention[J]. *International Journal of Obesity*, 2018, 42(3): 580-583
- [20] Li JJ, Pang B, Shao DY, Jiang CM, Hu XZ, Shi JL. *Artemisia sphaerocephala* Krasch polysaccharide mediates lipid metabolism and metabolic endotoxaemia in associated with the modulation of gut microbiota in diet-induced obese mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 147: 1008-1017
- [21] Dudonné S, Varin TV, Anhê FF, Dubé P, Roy D, Pilon G, Marette A, Levy É, Jacquot C, Urdaci M, et al. Modulatory effects of a cranberry extract co-supplementation with *Bacillus subtilis* CU1 probiotic on phenolic compounds bioavailability and gut microbiota composition in high-fat diet-fed mice[J]. *PharmaNutrition*, 2015, 3(3): 89-100
- [22] Genoni A, Christophersen CT, Lo J, Coghlan M, Boyce MC, Bird AR, Lyons-Wal P, Devine A. Long-term Paleolithic diet is associated with lower resistant starch intake, different gut microbiota composition and increased serum TMAO concentrations[J]. *European Journal of Nutrition*, 2020, 59(5): 1845-1858
- [23] Biddle AS, Tomb JF, Fan ZR. Microbiome and blood analyte differences point to community and metabolic signatures in lean and obese horses[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2018, 5: 225
- [24] Hou DZ, Zhao QY, Yousaf L, Khan J, Xue Y, Shen Q. Consumption of mung bean (*Vigna radiata* L.) attenuates obesity, ameliorates lipid metabolic disorders and modifies the gut microbiota composition in mice fed a high-fat diet[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64: 103687
- [25] Tang WJ, Yao XR, Xia F, Yang MT, Chen ZJ, Zhou BJ, Liu Q. Modulation of the gut microbiota in rats by Huguang Qingzhi tablets during the treatment of high-fat-diet-induced nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 2018: 7261619
- [26] Etxeberria U, Hijona E, Aguirre L, Milagro FI, Bujanda L, Rimando AM, Martínez JA, Portillo MP. Pterostilbene-induced changes in gut microbiota composition in relation to obesity[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, 61(1): 1500906
- [27] Rajilic-Stojanovic M, De Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(5): 996-1047
- [28] Wu TR, Lin CS, Chang CJ, Lin TL, Martel J, Ko YF, Ojcius DM, Lu CC, Young JD, Lai HC. Gut commensal *Parabacteroides goldsteinii* plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutella sinensis*[J]. *Gut Microbiota*, 2019, 68(2): 248-262
- [29] Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(4): 593-621
- [30] Schwalm III ND, Groisman EA. Navigating the gut buffet: control of polysaccharide utilization in *Bacteroides* spp.[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(12): 1005-1015
- [31] Xia YM, Fukunaga M, Kuda T, Goto M, Chiaraluce G, Hoshiba H, Takahashi H, Kimura B. Detection and isolation of protein susceptible indigenous bacteria affected by

- dietary milk-casein, albumen and soy-protein in the caecum of ICR mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 144: 813-820
- [32] Fukunaga M, Suriki K, Kuda T, Shikano A, Toyama A, Takahashi H, Kimura B. Typical indigenous bacteria in the cecum of ddY mice fed a casein-beef tallow diet or whole-egg diet[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(12): e13064
- [33] la Reau AJ, Meier-Kolthoff JP, Suen G. Sequence-based analysis of the genus *Ruminococcus* resolves its phylogeny and reveals strong host association[J]. Microbial Genomics, 2016, 2(12): e000099
- [34] Cann I, Bernardi RC, Mackie RI. Cellulose degradation in the human gut: *Ruminococcus champanellensis* expands the cellulosome paradigm[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(2): 307-310
- [35] Chung YW, Gwak HJ, Moon S, Rho M, Ryu JH. Functional dynamics of bacterial species in the mouse gut microbiome revealed by metagenomic and metatranscriptomic analyses[J]. PLoS One, 2020, 15(1): e0227886
- [36] Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. The gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1081
- [37] Pan YY, Zeng F, Guo WL, Li TT, Jia RB, Huang ZR, Lv XC, Zhang JC, Liu B. Effect of *Grifola frondosa* 95% ethanol extract on lipid metabolism and gut microbiota composition in high-fat diet-fed rats[J]. Food & Function, 2018, 9(12): 6268-6278
- [38] Jeraldo P, Hernandez A, Nielsen HB, Chen XF, White BA, Goldenfeld N, Nelson H, Alhquist D, Boardman L, Chia N. Capturing one of the human gut microbiome's most wanted: reconstructing the genome of a novel butyrate-producing, Clostridial scavenger from metagenomic sequence data[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 783
- [39] Ubeda C, Bucci V, Caballero S, Djukovic A, Toussaint NC, Equinda M, Lipuma L, Ling LL, Gobourne A, No D, et al. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(3): 965-973
- [40] Ai DM, Pan HF, Li XX, Gao YX, Liu G, Xia LC. Identifying gut microbiota associated with colorectal cancer using a zero-inflated lognormal model[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 826
- [41] Zeng MY, Inohara N, Nuñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut[J]. Mucosal Immunology, 2016, 10(1): 18-26
- [42] Baxter NT, Zackular JP, Chen GY, Schloss PD. Structure of the gut microbiome following colonization with human feces determines colonic tumor burden[J]. Microbiome, 2014, 2: 20
- [43] Canani RB, Di Costanzo M, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases[J]. World Journal of Gastroenterology, 2011, 17(12): 1519-1528
- [44] Ménard A, Smet A. Review: other *Helicobacter* species[J]. Helicobacter, 2019, 24(S1): e12645
- [45] Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 294(1): 1-8
- [46] Ramsay AG, Scott KP, Martin JC, Rincon MT, Flint HJ. Cell-associated  $\alpha$ -amylases of butyrate-producing firmicute bacteria from the human colon[J]. Microbiology, 2006, 152(11): 3281-3290
- [47] Augenlicht LH, Mariadason JM, Wilson A, Arango D, Yang WC, Heerdt BG, Velcich A. Short chain fatty acids and colon cancer[J]. The Journal of Nutrition, 2002, 132(12): 3804S-3808S