

研究报告

猪结肠源分离菌对结肠炎小鼠肠道细胞因子和转录因子表达的调节

凌乙丹, 程颖州, 潘龙, 慕春龙*, 朱伟云

南京农业大学动物科技学院 消化道微生物研究室 江苏省消化道营养与动物健康重点实验室 动物消化道营养国际联合研究中心, 江苏 南京 210095

凌乙丹, 程颖州, 潘龙, 慕春龙, 朱伟云. 猪结肠源分离菌对结肠炎小鼠肠道细胞因子和转录因子表达的调节[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2599-2613.

LING Yidan, CHENG Yingzhou, PAN Long, MU Chunlong, ZHU Weiyun. Bacteria from porcine colon regulate cytokine and transcription factor expression in the gut of the mouse model of colitis[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2599-2613.

摘要:【背景】哺乳动物消化道中的微生物对肠道稳态的维持十分重要, 但肠道细菌在调节细胞因子表达等方面发挥的调节作用还有待研究。【目的】探究猪肠道不同分离菌株在结肠炎模型中对细胞因子和转录因子的调节差异。【方法】从猪结肠分离培养单菌, 在脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导的 Caco-2 细胞炎症模型中, 用细菌上清液孵育细胞; 进一步试验采用葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎小鼠模型, 用细菌悬浮液进行灌胃, 检测细菌处理后 Caco-2 细胞和小鼠结肠组织中细胞因子和转录因子基因表达、细胞生长率、小鼠体重等指标。【结果】从猪结肠中分离得到 6 株菌, 分别属于 *Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Sharpea* 和 *Mitsuokella*。在 LPS 诱导炎症 Caco-2 细胞炎症模型中, *Lactobacillus amylovorus* LGM 显著下调白细胞介素(interleukin, IL)-4 和 IL-17 的 mRNA 表达($P<0.05$); *Enterococcus cecorum* LGM 处理显著下调 T 盒子转录因子(T-box expressed in T cells, T-bet)、叉状头转录因子 3 (forkhead box P3, Foxp3)、IL-17 和转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β) mRNA 表达($P<0.05$)。在菌液灌胃结肠炎小鼠试验中, 只有 *Lactobacillus amylovorus* LGM 能够明显改善结肠炎症, 恢复结肠长度, 结肠组织中 Foxp3、GATA 结合蛋白 3 (GATA binding protein 3, GATA-3)和干扰素- γ (interferon-gamma, IFN- γ) mRNA 表达上升($P<0.05$)。相反地, *Mitsuokella jalaludinii* LGM 处理加重结肠损伤, 组织中干扰素- γ mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。【结论】6 株分离菌对猪肠道结肠炎的调节作用不同, 这与不同菌株对细胞因子基因表达的调节有关。*Lactobacillus amylovorus* LGM 通过上调结肠中的转录因子 Foxp3 和 GATA-3 可以发挥一定程度的抗炎症作用。

关键词: 肠道微生物; 猪; 乳酸菌; 结肠炎; 细胞因子

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1300403)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1300403).

*Corresponding author. E-mail: muchunlong007@163.com

Received: 2023-09-11; Accepted: 2023-12-05; Published online: 2024-03-12

Bacteria from porcine colon regulate cytokine and transcription factor expression in the gut of the mouse model of colitis

LING Yidan, CHENG Yingzhou, PAN Long, MU Chunlong*, ZHU Weiyun

Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Jiangsu Key Laboratory of Gastrointestinal Nutrition and Animal Health, National Center for International Research on Animal Gut Nutrition, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Microorganisms in the mammalian digestive tract are important for maintaining gut homeostasis, while the regulatory role of gut bacteria in cytokine expression remains unclarified. [Objective] To compare the regulatory effects of different isolated from porcine intestinal tract on the expression of cytokines and transcription factors in the model of colitis. [Methods] Bacteria were isolated from the porcine colon, and the culture supernatant of each isolate was used to treat the Caco-2 cell model of lipopolysaccharide-induced inflammation. Furthermore, a mouse model of colitis was induced by dextran sodium sulfate (DSS) and then administrated with bacterial suspension by gavage. The gene expression of cytokines and transcription factors in Caco-2 cells and mouse colon tissue, the cell growth rate, and the mouse weight after bacterial treatment were determined. [Results] Six strains of bacteria were isolated from porcine colon, belonging to *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Sharpea*, and *Mitsuokella*. In the Caco-2 cell model of inflammation, *Lactobacillus amylovorus* LGM down-regulated the mRNA levels of interleukin (IL)-4 and IL-17 ($P<0.05$); *Enterococcus cecorum* LGM down-regulated the mRNA levels of T-box expressed in T cells (T-bet), forkhead box P3 (Foxp3), IL-17, and transforming growth factor- β (TGF- β) ($P<0.05$). In the mouse model of colitis, only *L. amylovorus* LGM alleviated the colon inflammation, restored the colon length, and up-regulated the mRNA levels of Foxp3, GATA Binding Protein 3 (GATA-3), and interferon- γ (IFN- γ) in the colon tissue ($P<0.05$). However, *Mitsuokella jalaludinii* LGM aggravated colon injury and up-regulated the mRNA level of interferon- γ in the tissue ($P<0.05$). [Conclusion] The bacterial isolates have different regulatory effects on porcine colitis, which is related to the regulation of cytokine gene expression. *L. amylovorus* LGM exerts an anti-inflammatory effect by up-regulating the expression of Foxp3 and GATA-3 in the colon.

Keywords: gut microorganisms; pigs; lactic acid bacteria; colitis; cytokines

猪肠道菌群结构复杂, 在肠道上皮稳态与肠道生理调节方面发挥重要作用^[1]。肠道微生物在免疫调节方面的作用可能存在菌株特异性, 研究发

现肠道微生物在宿主炎症反应中发挥重要调节作用。猪结肠中分离的 *Brachyspira hyodysenteriae* 诱导促炎细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-17

基因表达,同时引起炎症相关疾病^[2];革兰氏阴性菌的细菌表面糖脂脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)激活 Toll 样受体 4 (toll-like receptor-4, TLR-4)引发机体免疫反应导致炎症产生^[3]。肠道微生物也参与抗炎症免疫调节, *Bacteroides fragilis* 通过调节 IL-6、IL-8 和 IL-1 β 基因表达和核因子活化 B 细胞 κ 轻链增强子(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)通路来减轻结肠炎症^[4], *Lactobacillus jensenii* 调节 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路以及 IL-10 等细胞因子减轻炎症反应^[5]。乳酸菌 *Lactobacillus animalis* LGM 下调结肠炎小鼠促炎因子 IL-4 和 IL-17 mRNA 表达^[6]。

肠道微生物具有调节免疫系统中 T 细胞转录因子与细胞因子基因表达的作用,其中转录因子 T 盒子转录因子(T-box expressed in T cells, T-bet)、GATA 结合蛋白 3 (GATA binding protein 3, GATA-3)、RAR 相关孤儿受体(RAR-related orphan receptor gamma t, ROR- γ t)和叉状头转录因子 3 (forkhead box P3, Foxp3)调节幼稚 T 细胞的分化,诱导干扰素 γ (interferon-gamma, IFN- γ)、IL-4、IL-17 和 IL-10 基因表达。T-bet 和 GATA-3 与辅助性 T 细胞的平衡有关^[7];Foxp3 作为调节性 T 细胞的标志之一,与多种 T 细胞转录因子合作介导调节机体免疫平衡^[8];ROR- γ t 参与促炎反应^[9]。Kreuzer 等^[10]将粪肠球菌灌胃给伤寒沙门氏菌(*Salmonella Typhimurium*)感染的仔猪,发现回肠和盲肠肠系膜淋巴结中 Foxp3 和 GATA-3 的基因表达显著下调。*Lactobacillus plantarum* 和 *Bifidobacterium animalis* 在体内诱导淋巴结和脾脏中的 Foxp3 基因表达和 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T 细胞增殖^[11]。然而猪肠道细菌对转录因子和细胞因子基因表达的影响尚不清楚。

研究猪肠道来源的乳酸菌对免疫应答的调

节作用,有助于阐明其对肠道健康的影响。例如, *Lactobacillus plantarum* 在小鼠肠道中有效抑制伤寒沙门氏菌等有害菌的生长^[12]。本研究通过分离猪肠道菌株,并将其培养液上清通过与 LPS 处理的 Caco-2 细胞共培养,来分析对细胞的影响。同时,用葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导结肠炎小鼠,进行细菌菌悬液灌胃,研究细菌对肠道炎症的影响。

1 材料与方法

1.1 样品

Caco-2 细胞,实验室保存;C57BL/6J 小鼠(雌性,体重 18–22 g),南京市江宁区青龙山动物繁殖场,伦理委员会审批号: NJAU. No. 20220509096;杜长大三元杂交商品猪结肠,南京海发牧业有限公司。

1.2 培养基

DMEM 购自 Genom 公司;M2GSC 培养基参照文献^[6]配制。

1.3 主要试剂和仪器

乳酸测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;4%多聚甲醛溶液、DNA 提取试剂盒和琼脂糖凝胶,生工生物工程(上海)股份有限公司;Premix Taq 酶和细胞 RNA 提取试剂盒, Vazyme 公司;胎牛血清, Gen-view 科技有限公司;CCK-8 溶液,南京建成生物工程研究所;DSS,翌圣生物科技(上海)股份有限公司;PrimeScriptTM RT Master Mix 和 TB Green[®] Premix Ex TaqTM II, TaKaRa 公司。酶标仪, Tecan 公司;QuantStudio 7 Flex 实时定量 PCR 系统, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.4 细菌分离与乳酸含量分析

将含有 0.01% (质量分数)血红素的 M2GSC 培养基用 CO₂ 持续通气以获得厌氧环境, pH 值调节至 6.5,分装入血清瓶和 Hungate 管, 115 °C 灭菌 20 min。取杜长大三元杂交商品猪结肠内容

物, 37 °C PBS 溶液稀释、振荡后用灭菌纱布过滤收集接种液, 将接种液置于血清瓶中, 每 1 mL 接种液添加 9 mL M2GSC 培养基^[13], 37 °C 厌氧环境培养 48 h 后传代, 重复稀释、挑菌、培养, 将第 3 次传代培养物在 Hungate 管中连续稀释, 培养 24 h 后挑取单菌落, 接种在新的 M2GSC 培养基上, 37 °C 培养 24 h, 单挑获得纯化单克隆菌。所有分离的菌株培养 24 h, 用乳酸测定试剂盒检测细菌乳酸产量。

1.5 细菌 DNA 提取和 16S rRNA 基因鉴定

使用 DNA 提取试剂盒提取分离菌株的 DNA, 根据细菌 16S rRNA 基因引物 8F (5'-CAC GGATCCAGAGTTTGACATGGCTCAG-3') 和 1510R (5'-GTGAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR。基础 PCR 反应体系 (20 μ L): 200 ng 基因组 DNA, Premix Taq 酶 10 μ L, 上、下游引物 (20 μ mol/L) 各 1 μ L, ddH₂O 补足 20 μ L。PCR 反应体系: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 68 °C 60 s, 35 个循环; 68 °C 10 min; 4 °C 保存。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物合格后交由上海英骏生物技术有限公司测序。使用 BLAST (NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对 16S rRNA 基因序列进行分析, 与数据库中已知序列进行同源性比对, 获取相似性较高的相关序列, 用 MEGA 7.0 软件的 Maximum Likelihood 构建系统发育树。

1.6 细菌培养上清液与悬液制备

根据生长曲线, 在 OD₆₀₀ 为 1.0 时取出 1 mL 细菌悬浮液, 4 °C、12 000×g 离心 10 min 取上清, 并用无菌 0.22 μ m 滤膜过滤, 保存得上清液。*E. cecorum* LGM、*L. mucosae* LGM、*L. amylovorus* LGM 和 *M. jalaludinii* LGM 结肠分离菌在 37 °C 恒温培养箱中厌氧培养, 接种于密闭 Hungate 滚管中传代。菌悬液基于 Hungate 滚管技术对其进行计数, 调整至 5×10⁹ CFU/mL。培

养 24 h 后取出 1 mL 菌悬液, 梯度稀释至 10⁻¹⁰ 倍。所有试管均于 37 °C 培养并计数菌落数。

1.7 Caco-2 细胞培养和细菌上清液孵育细胞

Caco-2 细胞在 37 °C、5% CO₂ 的环境中培养, 完全培养基为含有 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素和 10 % (体积分数) 胎牛血清的 DMEM。将 Caco-2 细胞复苏后, 接种 1×10⁵ 个细胞于细胞培养瓶中, 培养至细胞密度达到 80%–90%, 进行传代, 接种于 24 孔板中, 每孔 1×10⁵ 个细胞, 当细胞分布率达 80%–90% 即可进行处理。将 Caco-2 细胞于 DMEM 培养基、LPS (2 μ g/mL) 和各种细菌上清液共同培养 24 h。收集细胞用于总 RNA 提取和荧光定量 PCR (quantitative polymerase chain reaction, qPCR)。

1.8 细胞活力检测

在 96 孔板中每孔接种 1×10⁵ 个细胞, 与细菌上清液共同孵育培养。在细胞培养结束时每孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续 37 °C 孵育 2 h, 用酶标仪检测 A₄₅₀, 计算细胞活力^[14]。细胞活力计算公式:

$$\text{细胞活力(\%)} = \frac{A_{450}(\text{处理组}) - A_{450}(\text{空白})}{A_{450}(\text{对照组}) - A_{450}(\text{空白})} \times 100。$$

1.9 DSS 诱导结肠炎与细菌悬浮液给药

将 30 只 C57BL/6J 小鼠随机分为 6 组, 每组 5 只, 适应性饲养一周后进行结肠炎造模试验。预先将 DSS (分子量 36 000–50 000) 用水溶解为 3% (质量体积分数) 的溶液。

试验组小鼠用 3% 的 DSS 溶液给水一周以诱导结肠炎, 空白对照组其他条件不变, 纯净水给水^[15]。每天测量体重, 在结肠炎造模过程中观察血便情况。在 DSS 诱导结肠炎一周后, 0.2 mL/D 细菌悬浮液 (1×10⁹ CFU/mL) 每天连续灌胃小鼠一周, 对照组灌胃等量无菌培养基, 每天测定体重, 灌胃第 7 天采样。

测量小鼠结肠并采样结肠组织, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。从结肠中段取样约 1 cm , 用 4% 多聚甲醛溶液浸泡固定。组织切片、石蜡包埋和 HE 染色方案均由南京奥青生物技术有限公司提供。

1.10 基因表达分析

采用细胞 RNA 提取试剂盒提取 Caco-2 细胞和结肠组织的总 RNA, 采用酶标仪测量质量和纯度。使用 PrimeScriptTM RT Master Mix 逆转录 $1\text{ }000\text{ ng}$ 总 RNA, 使用 TB Green[®] Premix Ex TaqTM II 通过 qPCR 检测转录因子和细胞内细胞因子的基因表达水平。PCR 反应体系($20\text{ }\mu\text{L}$): 200 ng cDNA, Premix Taq 酶 $10\text{ }\mu\text{L}$, 上、下游引物($20\text{ }\mu\text{mol/L}$) $0.4\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O 补足 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应采用 QuantStudio 7 Flex 实时定量 PCR 系统检测, 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 35 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 34 s , 40 个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s , 引物见表 1 与表 2。平均循环阈值(cycle threshold, Ct)使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算。

表 1 Caco-2 细胞荧光定量引物

Table 1 Primers used for qPCR in Caco-2 cells

Gene name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	References
T-bet	F: CCCCTTGGTGTGGACTGAGA	87	61.13	[7]
	R: ACGCGCCTCCTCTTAGAGTC		61.38	
GATA-3	F: GTCCTCCCTGAGCCACATCT	98	60.98	
	R: GTGGTCCAAAGGACAGGCTG		60.89	
ROR- γ t	F: GGCTCCCTGGATGAATAGAATG	190	58.32	[16]
	R: AGGCAGAGGCAGAAAATGTAAAG		59.24	
Foxp3	F: TCCCAGAGTTCCTCCACAAC	122	58.94	[17]
	R: ATTGAGTGTCCGCTGCTTCT		59.68	
IL-4	F: CACAAGTGCGATATCACCTT	386	55.85	[18]
	R: GCTCGAACACTTTGAATATT		51.90	
IL-17	F: GGTTTGACTGAGTACCAATTTGC	172	58.45	[19]
	R: AAATTCCCAAGCCCAGAATC		55.95	
TGF- β	F: GGGACTATCCACCTGCAAGA	239	58.80	[20]
	R: CCTCCTTGGCGTAGTAGTCG		59.62	
β -actin	F: CACTGTGCCCATCTACGAGG	154	60.18	[21]
	R: AATGTCACGCACGATTCC		56.64	

1.11 统计与分析

使用 SPSS 25.0 分析数据, one-way ANOVA 进行统计学分析, LSD 法进行多重比较, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 结肠细菌分离与鉴定及乳酸产量的测定

根据分离出的菌株 16S rRNA 基因序列与基因库序列进行比对, 鉴定分离菌株与 *Enterococcus faecium* LGM、*Enterococcus cecorum* LGM、*Lactobacillus mucosae* LGM、*Lactobacillus amylovorus* LGM、*Sharpea azabuensis* LGM 和 *Mitsuokella jalaludinii* LGM 相似性最高, 分离菌株和参考菌株的关系显示在基于 16S rRNA 基因序列的 Maximum Likelihood 法系统发育树中(图 1), 它们分属于 *Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Sharpe*、*Mitsuokella*。

表 2 结肠炎小鼠结肠组织荧光定量引物

Table 2 Primers used for qPCR in colitis mice colon tissue

Gene name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)	T_m (°C)	References
T-bet	F: GCCAGGGAACCGCTTATATG	136	58.48	[22]
	R: GACGATCATCTGGGTCACATTGT		60.68	
GATA-3	F: CCTTAAACTCTTGGCGTCC	533	56.73	[23]
	R: AGACACATGTCATCCCTGAG		56.63	
ROR- γ t	F: TGTTTTATGGGGTTTGGGTATG	122	56.56	[24]
	R: CTGTGTGGATGTGTGTCTCTGATTA		60.57	
Foxp3	F: CTCATGATAGTGCCTGTGTCCTCAA	93	62.36	[25]
	R: AGGGCCAGCATAGGTGCAAG		62.56	
IFN- γ	F: CACTGCATCTTGGCTTTGCA	252	59.68	[26]
	R: GCTGATGGCCTGATTGTCTTTC		59.90	
IL-4	F: CACGGATGCGACAAAAATCAC	251	58.76	[27]
	R: CGAAAAGCCCCGAAAGAGTCTCT		60.61	
IL-17	F: TATCCCTCTGTGATCTGGGAAG	161	58.42	[28]
	R: ATCTTCTCGACCCTGAAAGTGA		58.83	
IL-10	F: CTTACTGACTGGCATGAGGATCA	101	59.87	[29]
	R: GCAGCTCTAGGAGCATGTGG		60.53	
β -actin	F: CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	171	61.48	[30]
	R: ATGGAGCCACCGATCCACA		61.00	

结肠分离菌在梯度 pH (3.5–8.5) 下对各单菌进行条件培养, 不同菌株的最佳生长 pH 不同(图 2A), *E. faecium* LGM、*M. jalaludinii* LGM 和 *S. azabuensis* LGM 宜在弱碱环境中生长, 最佳生长 pH 7.5–8.5; *E. cecorum* LGM 和 *L. mucosae* LGM 最佳生长 pH 6.5, 中性环境; *L. amylovorus* LGM 最佳生长 pH 5.5–6.5, 弱酸环境。强酸环境(pH 3.5–4.5)在极大程度上抑制结肠分离菌的生长。

结肠分离菌培养 24 h 后, *E. faecium* LGM 和 *E. cecorum* LGM 积累乳酸最多, 分别为 49.38 mmol/L 和 48.03 mmol/L; *M. jalaludinii* LGM 和 *L. mucosae* LGM 积累乳酸最少, 分别为 8.67 mmol/L 和 13.35 mmol/L; *S. azabuensis* LGM 和 *L. amylovorus* LGM 积累乳酸量较高, 分别为 37.55 mmol/L 和 33.81 mmol/L; 相较于 *E. faecium* LGM 和 *E. cecorum* LGM, *S. azabuensis* LGM 产乳酸量显著较低, *L. amylovorus* LGM 则相较于 *S. azabuensis* LGM 显著更低(图 2B)。

2.2 细菌对 Caco-2 细胞转录因子和细胞因子基因表达水平的影响

细菌培养上清液对细胞内转录因子表达调节作用具有种类特异性。与空白对照相比, LPS 处理后细胞内转录因子 GATA-3 和 ROR- γ t 基因表达显著下调。相较于 LPS 组, *E. cecorum* LGM、*L. amylovorus* LGM 和 *M. jalaludinii* LGM 处理后细胞中 T-bet 基因的表达显著下调($P < 0.05$); *E. cecorum* LGM、*L. mucosae* LGM、*L. amylovorus* LGM、*M. jalaludinii* LGM 和 *S. azabuensis* LGM 组中 GATA-3 mRNA 表达上调, 其中 *E. cecorum* LGM 组 GATA-3 mRNA 表达显著高于空白对照组($P < 0.05$); *L. amylovorus* LGM 组和 *M. jalaludinii* LGM 组中 T-bet mRNA 表达显著下调($P < 0.05$), 与对照组表达水平一致; *E. cecorum* LGM 组和 *M. jalaludinii* LGM 组中 Foxp3 mRNA 表达水平显著上调($P < 0.05$); *L. amylovorus* LGM 组中 Foxp3 mRNA 表达显著高于空白对照组与 LPS 组(图 3A, $P < 0.05$)。

相较于对照组, LPS 处理组显著上调细胞因子 IL-4、IL-17 的 mRNA 表达, 下调 TGF- β 的 mRNA 表达(图 3B, $P<0.05$)。与 LPS 组相比, *L. amylovorus* LGM、*S. azabuensis* LGM 和 *M. jalaludinii* LGM 组显著下调 IL-4 mRNA 水平($P<0.05$); *E. cecorum* LGM、*L. mucosae* LGM、*L. amylovorus* LGM、*S. azabuensis* LGM 和 *M. jalaludinii* LGM 组 IL-17 mRNA 水平显著下调($P<0.05$), 且均显著低于空白对照组, 其中 *M. jalaludinii* LGM 组下调程度极显著($P<0.05$); *E.*

cecorum LGM、*L. mucosae* LGM、*S. azabuensis* LGM 和 *M. jalaludinii* LGM 均显著下调细胞内 TGF- β mRNA 水平(图 3B, $P<0.05$)。

细胞生长率提示 Caco-2 细胞活性, LPS 处理后 Caco-2 细胞活性显著下调; 与 LPS 组相比, *E. cecorum* LGM、*S. azabuensis* LGM、*L. mucosae* LGM、*L. amylovorus* LGM 和 *M. jalaludinii* LGM 组均显著下调 Caco-2 细胞活性, 其中 *E. cecorum* LGM 和 *S. azabuensis* LGM 组细胞活性显著低于其他菌液处理组(图 3C, $P<0.05$)。

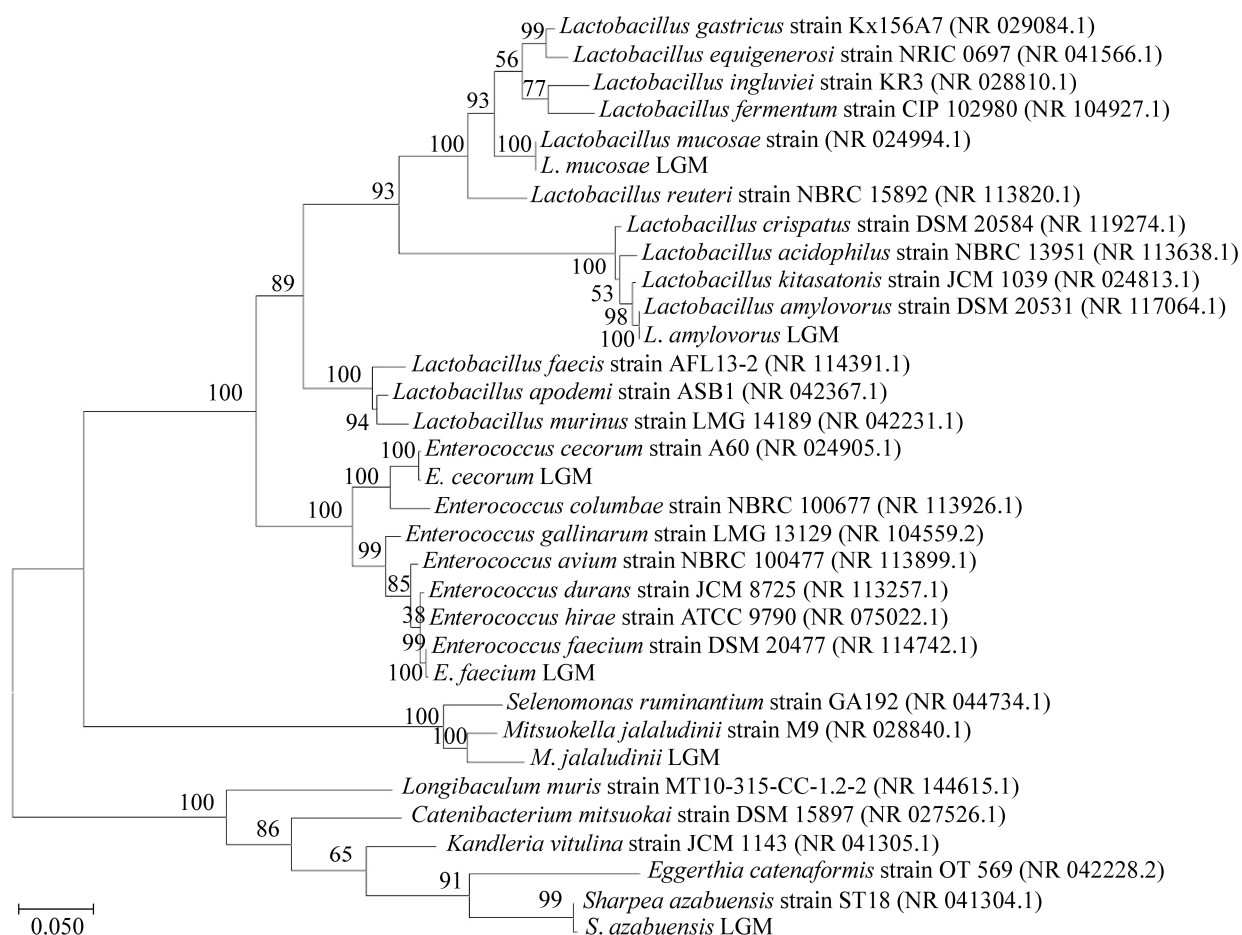


图 1 分离菌株与参考菌株的最大相似系统发育树 比例尺位置表示推断存在 0.050 个核苷酸可替换; 分支点数值为自展值; 括号内为该菌株在 NCBI 数据库中 NR 编号

Figure 1 The maximum similarity phylogenetic tree of isolated and reference bacteria. The scale bar indicates 0.050 inferred nucleotide substitutions per position; The intersection value is the bootstrap value; The number in brackets is the NR number of the strain in the NCBI database.

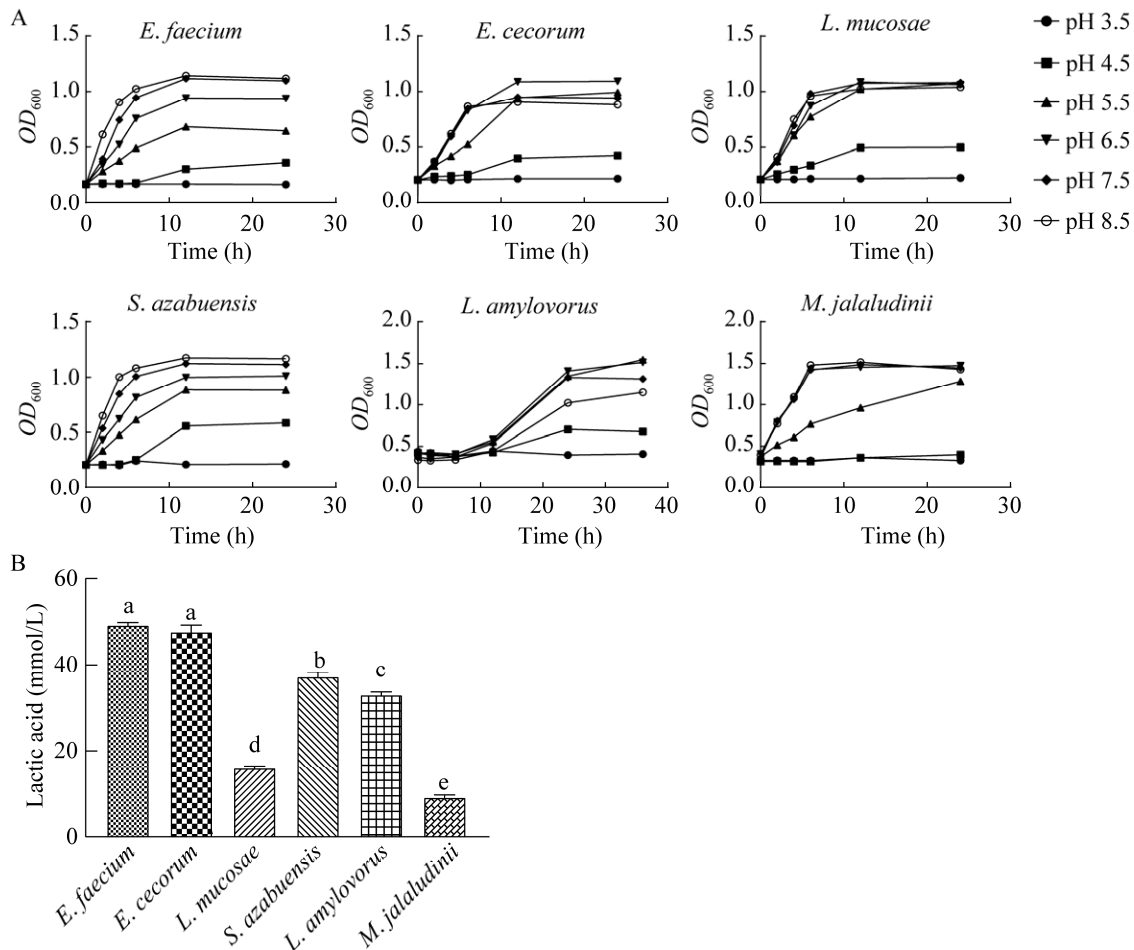


图 2 不同 pH 下的生长曲线及培养 24 h 的乳酸积累量 不同小写字母表示差异存在统计学意义 ($P<0.05$). 下同

Figure 2 Growth curves at different pH and lactic acid accumulation after 24 hours of cultivation. Different lowercase letters mean significant differences ($P<0.05$). The same below.

2.3 细菌对结肠炎小鼠的影响

E. cecorum LGM、*L. amylovorus* LGM 和 *M. jalaludinii* LGM 菌株在细胞试验中表现出对转录因子基因表达的显著影响, 因此选择这 3 株分离菌灌胃小鼠。与对照组相比, DSS 诱导的小鼠在第 6–7 天表现出易受惊吓, 便血现象, 同时体重显著下调, *M. jalaludinii* LGM 组小鼠体重显著低于 DSS 组(图 4, $P<0.05$)。DSS 诱导小鼠结肠长度显著下调, 表层上皮损伤, 上皮细胞脱落, 隐窝变浅, 大量炎性细胞浸润, 下层结缔组织疏松, 杯状细胞减少(图 5A, $P<0.05$)。与 DSS 组相比, *E. cecorum*

LGM 和 *L. amylovorus* LGM 菌液灌胃组小鼠体重差异不显著, *E. cecorum* LGM 组仍有上皮损伤, 黏膜上皮有少量细胞坏死脱落, *L. amylovorus* LGM 上皮损伤情况明显改善, 无上皮细胞脱落, 边缘清晰, 状况良好(图 5B)。 *M. jalaludinii* LGM 菌悬液灌胃组小鼠体重表现显著降低, 上皮细胞脱落严重, 边缘模糊, 上皮柱状细胞损伤严重, 结缔组织疏松水肿明显, 大量炎性细胞浸润($P<0.05$)。在结肠长度方面, 与 DSS 组相比, *L. amylovorus* LGM 菌液灌胃小鼠结肠长度显著增加, 显著高于空白对照组(图 5C, $P<0.05$)。

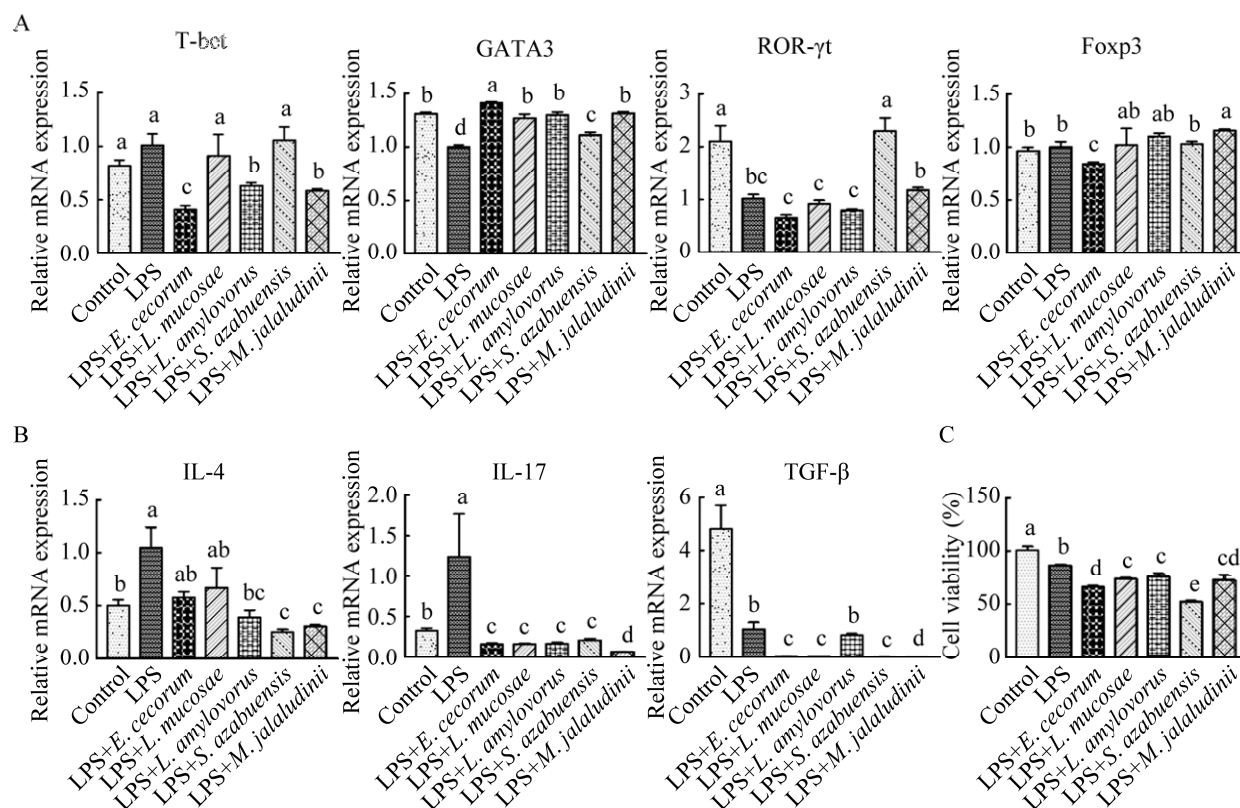


图3 不同菌液上清孵育对 Caco-2 细胞转录因子、细胞因子基因表达和细胞活力的影响

Figure 3 The effects of different bacterial culture supernatants on the expression of transcription factors, cytokine genes, and cell viability of Caco-2 cells.

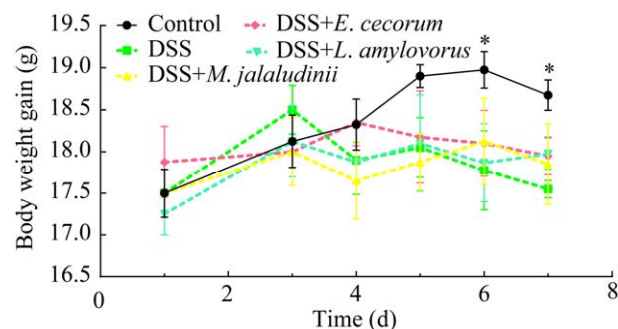


图4 不同菌悬液对 DSS 结肠炎模型小鼠体重影响数据展示方式: 平均值 \pm 均值标准误差。*: 对照组与其他实验组存在显著差异, $P<0.05$ 。

Figure 4 The effect of different bacterial suspensions on the body weight of DSS colitis model mice. Data are shown as mean \pm standard error of mean. *: Significant differences exist between the control group and other groups ($P<0.05$).

与对照组相比, DSS 组小鼠结肠转录因子 (T-bet、GATA-3、ROR- γ t 和 Foxp3) mRNA 表达显著下调(图 6A, $P<0.05$); 细胞因子 IL-4、IL-17、TGF- β mRNA 表达显著上调, IL-10 mRNA 表达显著下调(图 6B, $P<0.05$)。

与 DSS 组相比, *E. cecorum* LGM 显著上调转录因子 T-bet 和 Foxp3 mRNA 表达, 同时显著上调细胞因子 IFN- γ 和 IL-10 mRNA 表达, 下调转录因子 GATA-3 和细胞因子 IL-4、IL-17 和 TGF- β mRNA 表达($P<0.05$)。 *L. amylovorus* LGM 给药显著上调 GATA-3、IFN- γ 和 Foxp3 mRNA 表达($P<0.05$)。值得注意的是, *M. jalaludinii* LGM 组 IFN- γ mRNA 表达显著上调, IL-10 mRNA 表达显著下调, IFN- γ 、IL-4、TGF- β

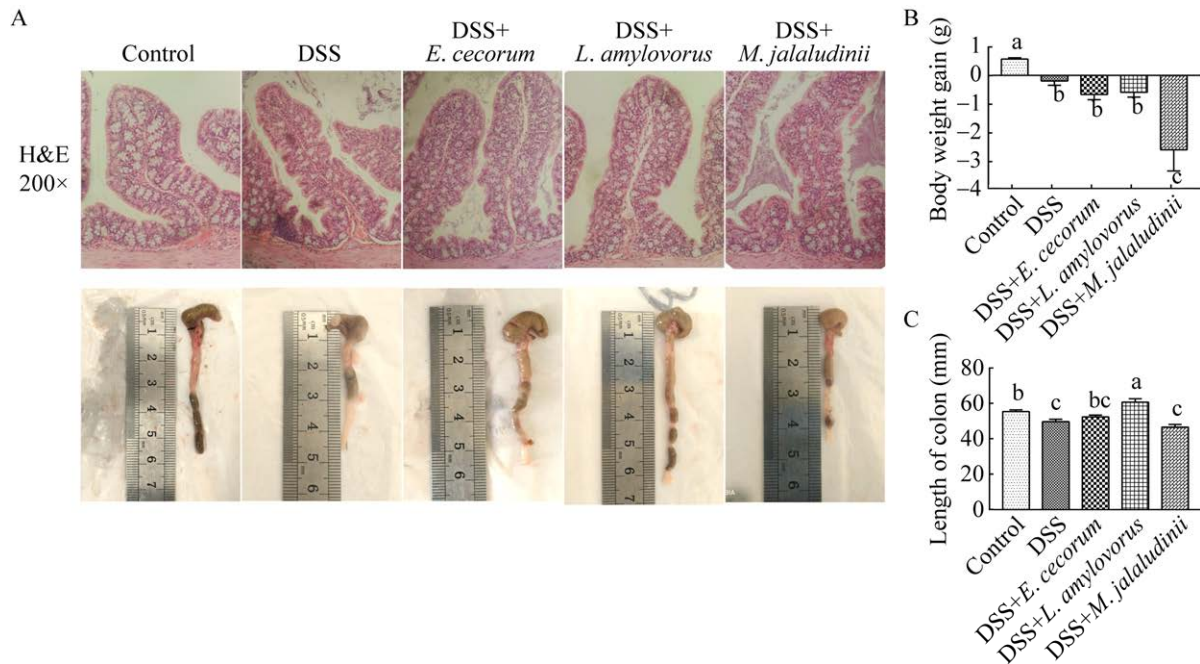


图5 不同菌悬液对DSS诱导小鼠结肠炎临床表型影响 A: HE染色结肠组织代表性石蜡切片(200×). B: 口服给药后体重上调情况. C: 各组结肠长度

Figure 5 Effects of different bacterial suspensions on the clinical phenotype of DSS-induced colitis in mice. A: representative paraffin sections of colonic tissues stained with HE (200×). B: The body weight alteration at the end of the orally administrated experiment. C: Colon length in each group.

和 IL-17 mRNA 表达情况均显著高于空白对照组, IL-10 mRNA 表达显著低于对照组 ($P<0.05$)。转录因子和细胞因子的整体变化总结见表 3。

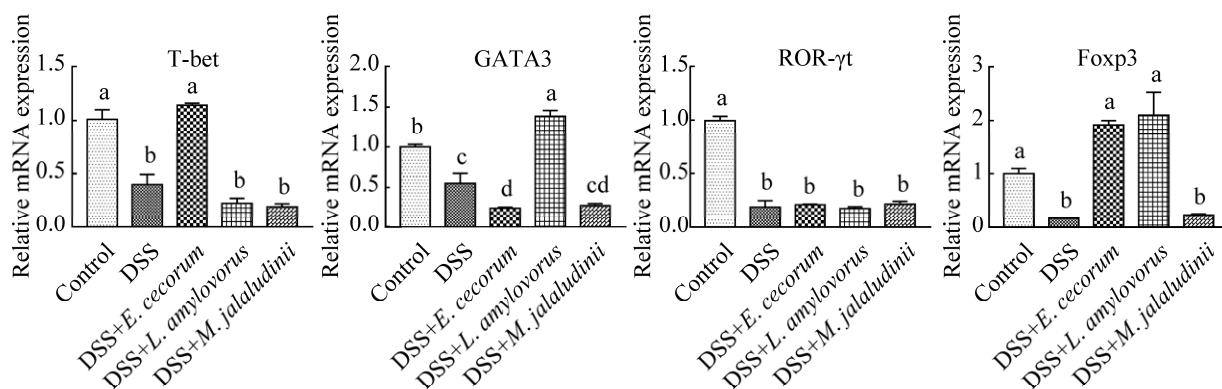
3 讨论与结论

本研究从猪结肠内分离出 6 株细菌, 使用 LPS 诱导细胞炎症模型和 DSS 诱导小鼠结肠炎模型评估猪结肠分离菌对肠道转录因子和细胞因子基因表达的影响。

Lactobacillus mucosae 和 *Lactobacillus amylovorus* 均属于乳酸菌, 其中 *Lactobacillus mucosae* 具有益生效果, 可以调节胆汁酸组成与免疫因子的分泌^[31]。在本研究分离获得的菌株中, *L. mucosae* LGM、*L. amylovorus* LGM 能够有效改善结肠炎症。在 LPS 诱导炎症的 Caco-2 细胞中, *L. amylovorus* LGM 菌液上清处理可下

调 T-bet 和 IL-17 mRNA 表达, 表明 *L. amylovorus* LGM 可能抑制 Th1/2 介导的免疫反应。T-bet、GATA-3 和 ROR- γ t 分别是 Th1、Th2 和 Th17 细胞的分化标志因子, T-bet 和 GATA-3 可以在 T 细胞免疫反应中表达, T-bet 的上调是机体 T 细胞响应炎症所必须的^[32]。Foxp3⁺调节性 T 细胞被 *Faecalibacterium prausnitzii* 诱导, 激活 DP8 α ⁺ 调节性 T 细胞来减轻结肠炎, 发挥抗炎作用^[33]。在 DSS 诱导结肠炎模型中, *L. amylovorus* LGM 上调 Foxp3 和 IFN- γ mRNA 表达, 这可能与超激动 CD28 特异性抗体对结肠炎的保护作用增强有关^[34]。此外, *L. amylovorus* LGM 上调 GATA-3 mRNA 表达。ROR- γ t 和 GATA-3 可以调节炎症, Foxp3⁺ROR- γ t⁺ T 细胞专注调节肠道的免疫反应, 在结肠炎模型中表现出显著的抗炎能力^[35], 这些变化表明 *L. amylovorus* LGM 对肠道损伤可能具有保护作用。

A



B

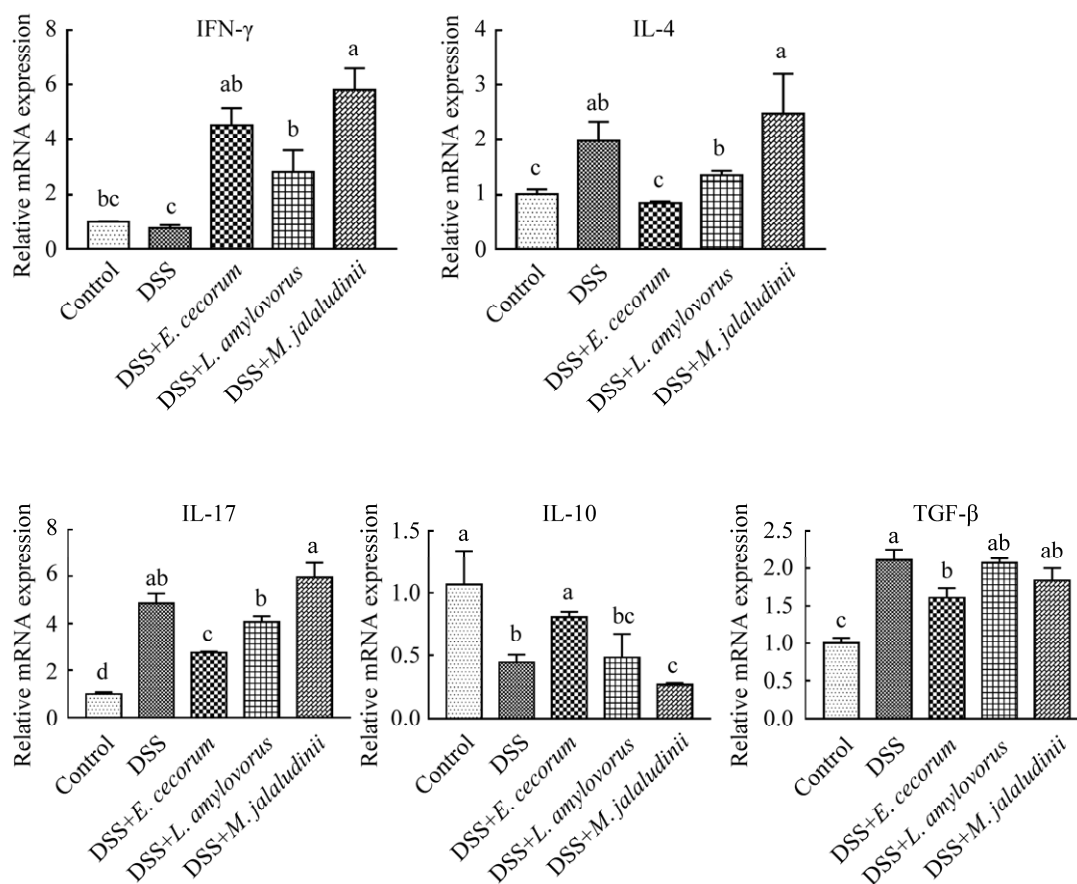


图6 不同菌悬液灌胃对DSS诱导结肠炎小鼠模型的结肠组织转录因子(A)及细胞因子(B) mRNA表达水平的影响

Figure 6 The effect of gavage with different bacterial suspensions on the mRNA expression levels of transcription factors (A) and cytokines (B) in colon tissue of DSS induced colitis mouse model.

表 3 转录因子和细胞因子的总体表达变化总结

Table 3 Summary of variation of mRNA expression of transcription factors and cytokine genes

Index	<i>Enterococcus cecorum</i>		<i>Lactobacillus amylovorus</i>		<i>Mitsuokella jalaludinii</i>	
	LPS+cells	DSS+mice	LPS+cells	DSS+mice	LPS+cells	DSS+mice
T-bet	↓	↑	↓	↔	↓	↔
GATA-3	↑	↓	↑	↑	↑	↔
ROR-γt	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Foxp3	↓	↑	↔	↑	↑	↔
IL-4	↔	↓	↓	↔	↓	↔
IL-17	↓	↓	↓	↔	↓	↔
TGF-β	↓	↓	↔	↔	↓	↔
Body weight gain	NA	↔	NA	↔	NA	↓
Colon length	NA	↔	NA	↑	NA	↔

变化方向为: ↓表示减少; ↑表示上调; ↔表示与 LPS 处理的细胞或 DSS 诱导的结肠炎小鼠相比无变化; NA 表示无数据
 Direction of change: ↓ means decreased; ↑ means increased; ↔ means unchanged, compared with LPS-treated cells or DSS-induced colitis mice. NA: Not available.

本研究从猪结肠中分离出 2 株少见菌株 *Sharpea azabuensis* 和 *Mitsuokella jalaludinii*, 前者最早由 Morita 等从瘤胃中分离出梭菌 XVII 簇的 *Sharpea*^[36], 本研究首次从猪结肠内容物中分离出 *S. azabuensis*, 其菌液上清可下调 Caco-2 细胞中促炎细胞因子(IL-4 和 IL-17)的表达, 揭示其在炎症反应中潜在的调节功能。*S. azabuensis* 是参与瘤胃乳酸产生和利用的重要细菌, 可能参与绵羊体内丁酸合成过程^[37], 因此 *S. azabuensis* 也可能在猪结肠发酵过程中发挥重要作用。此外, 本研究发现 *M. jalaludinii* LGM 灌胃加剧小鼠结肠炎症状, 导致小鼠体重减轻和肠道损伤情况加重, 表明 *M. jalaludinii* LGM 具有促炎作用。Levine 等^[38]发现猪肠道中的 *M. jalaludinii* 可以抑制鼠伤寒沙门氏菌的生长, 表明其可以在宿主抵御病原体的免疫反应中发挥作用, 但是基于目前已有结果, *M. jalaludinii* LGM 是否可以作为益生菌使用还有待进一步验证。

菌株对转录因子和细胞因子调节具有特异性。本研究发现, *S. aszabuensis* LGM 可以诱导 ROR-γt 表达, 而 *L. amylovorus* LGM 和 *M.*

jalaludinii LGM 可以诱导 LPS 孵育细胞的 T-bet 表达, 提示不同菌株在 T 细胞分化过程中的特异性调节。类似地, *Lactococcus lactis* 上调橄榄比目鱼肠道中 Foxp3、IL-10 等因子 mRNA 表达, *Lactobacillus plantarum* 则显著促进促炎基因 (T-bet、IL-1β 和 IFN-γ) 和 CD18 mRNA 表达^[39], 这些结果表明细菌对免疫调节的菌株特异性。

本研究发现猪结肠乳酸菌在体内外炎症环境下对细胞因子表达调节存在差异。*L. amylovorus* LGM 和 *M. jalaludinii* LGM 在体外可以下调促炎细胞因子的表达, 而在 DSS 诱导结肠炎小鼠体内, *L. amylovorus* LGM 可以缓解结肠炎, 结肠组织内 GATA-3 和 Foxp3 的 mRNA 上调表明猪 *L. amylovorus* LGM 可能通过上调 Foxp3 和 GATA-3 的表达来维持肠道环境稳态。

本研究通过体内、体外两种炎症模型揭示了猪肠道分离菌对炎症因子与细胞因子的不同调节作用。其中, *L. amylovorus* LGM、*L. mucosae* LGM 可以缓解结肠炎, *M. jalaludinii* LGM 加剧结肠炎, 影响肠道健康。这些结果为研究猪肠道细菌对转录因子和细胞因子表达的调节机制提供了参考。

REFERENCES

- [1] XUE C, LI GL, GU XY, SU YS, ZHENG QX, YUAN X, BAO ZY, LU J, LI LJ. Health and disease: *Akkermansia muciniphila*, the shining star of the gut flora[J]. Research, 2023, 6: 0107.
- [2] QUINTANA-HAYASHI MP, NAVABI N, MAHU M, VENKATAKRISHNAN V, FERNANDEZ HR, HAESBROUCK F, PASMANS F, LINDÉN SK. Neutrophil elastase and interleukin 17 expressed in the pig colon during *Brachyspira hyodysenteriae* infection synergistically with the pathogen induce increased mucus transport speed and production via mitogen-activated protein kinase 3[J]. Infection and Immunity, 2017, 85(8): e00262-e00217.
- [3] CANDELLI M, FRANZA L, PIGNATARO G, OJETTI V, COVINO M, PICCIONI A, GASBARRINI A, FRANCESCHI F. Interaction between lipopolysaccharide and gut microbiota in inflammatory bowel diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(12): 6242.
- [4] HE Q N M, BI J, DU N, LIU S, YANG K, LI H, YAO J, DU Y, DUAN Y. Protective effect of *Bacteroides fragilis* on TNF- α -induced inflammatory changes in human colon epithelial cells and in inflammatory bowel disease mouse model [J]. Science Report, 2023, 13(1): 15842.
- [5] SATO N, GARCIA-CASTILLO V, YUZAWA M, ISLAM MA, ALBARRACIN L, TOMOKIYO M, IKEDA-OHTSUBO W, GARCIA-CANCINO A, TAKAHASHI H, VILLENA J, KITAZAWA H. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* TL2937 alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis by differentially modulating the transcriptomic response of intestinal epithelial cells[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 2174.
- [6] 程颖州, 慕春龙, 朱伟云. 一株猪肠道 *Lactobacillus animalis* LGM 对结肠炎小鼠 Th 细胞分化转录因子基因表达的影响[J]. 微生物学报, 2019, 59(9): 1765-1777.
- CHENG YZ, MU CL, ZHU WY. Effects of *Lactobacillus animalis* LGM on transcription factors gene expressions in DSS-induced colitis mice[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(9): 1765-1777 (in Chinese).
- [7] BAHRIA-SEDIKI IB, YOUSFI N, PAUL C, CHEBIL M, CHERIF M, ZERMANI R, EL GAAIED AB, BETTAIEB A. Clinical significance of T-bet, GATA-3, and Bcl-6 transcription factor expression in bladder carcinoma[J]. Journal of Translational Medicine, 2016, 14(1): 144.
- [8] COLAMATTEO A, CARBONE F, BRUZZANITI S, GALGANI M, FUSCO C, MANISCALCO GT, Di RELLE F, de CANDIA P, de ROSA V. Molecular mechanisms controlling Foxp3 expression in health and autoimmunity: from epigenetic to post-translational regulation[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 10: 3136.
- [9] EBERL G. ROR γ t, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces[J]. Mucosal Immunology, 2017, 10(1): 27-34.
- [10] KREUZER S, RIEGER J, STRUCKEN EM, THABEN N, HÜNIGEN H, NÖCKLER K, JANCZYK P, PLENDL J, BROCKMANN GA. Characterization of CD4⁺ subpopulations and CD25⁺ cells in ileal lymphatic tissue of weaned piglets infected with *Salmonella* Typhimurium with or without *Enterococcus faecium* feeding[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2014, 158(3/4): 143-155.
- [11] SALEHIPOUR Z, HAGHMORAD D, SANKIAN M, RASTIN M, NOSRATABADI R, SOLTAN DALLAL MM, TABASI N, KHAZAEI M, NASIRAI LR, MAHMOUDI M. *Bifidobacterium animalis* in combination with human origin of *Lactobacillus plantarum* ameliorate neuroinflammation in experimental model of multiple sclerosis by altering CD4⁺ T cell subset balance[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 95: 1535-1548.
- [12] 孙宏, 卢志超, 吴逸飞, 王新, 柳永, 姚晓红, 汤江武. 猪源乳酸菌的筛选、体外益生效果评价及对小鼠肠道菌群的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2016, 52(19): 66-70.
- SUN H, LU ZC, WU YF, WANG X, LIU Y, YAO XH, TANG JW. Isolation and probiotic assessment of lactic acid bacteria strains from piglets and its *in vivo* effects on intestinal microbial population of mice[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2016, 52(19): 66-70 (in Chinese).
- [13] MIYAZAKI K, MARTIN JC, MARINSEK-LOGAR R, FLINT HJ. Degradation and utilization of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis*) B(1)4[J]. Anaerobe, 1997, 3(6): 373-381.
- [14] XIONG H, ZHANG ZG, TIAN XQ, SUN DF, LIANG QC, ZHANG YJ, LU R, CHEN YX, FANG JY. Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell

- invasion in colorectal cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2008, 10(3): 287-297.
- [15] WIRTZ S, POPP V, KINDERMANN M, GERLACH K, WEIGMANN B, FICHTNER-FEIGL S, NEURATH MF. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12: 1295-1309.
- [16] WANG LL, TANG PH, SHI CG, WAN YH, TANG W, HOU XX, PAN NL, SHI YB, TAO QL. Expression of CD39 mRNA is altered in the peripheral blood of patients with allergic asthma[J]. *Biomedical Reports*, 2014, 2(1): 75-78.
- [17] LIU YY, XIA TT, JIN CH, GU DM, YU J, SHI WQ, ZHANG KE, ZHANG LP, YE JX, LI L. FOXP3 and CEACAM6 expression and T cell infiltration in the occurrence and development of colon cancer[J]. *Oncology Letters*, 2016, 11(6): 3693-3701.
- [18] NILSEN EM, LUNDIN KE, KRAJCI P, SCOTT H, SOLLID LM, BRANDTZAEG P. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma[J]. *Gut*, 1995, 37(6): 766-776.
- [19] MARDEGAN GP, SHIBLI JA, ROTH LA, FAVERI M, GIRO G, BASTOS MF. Transforming growth factor- β , interleukin-17, and IL-23 gene expression profiles associated with human peri-implantitis[J]. *Clinical Oral Implants Research*, 2017, 28(7): e10-e15.
- [20] SHIBATA SI, MARUSHIMA H, ASAKURA T, MATSUURA T, EDA H, AOKI K, MATSUDAIRA H, UEDA K, OHKAWA K. Three-dimensional culture using a radial flow bioreactor induces matrix metalloprotease 7-mediated EMT-like process in tumor cells via TGF β 1/Smad pathway[J]. *International Journal of Oncology*, 2009, 34(5): 1433-1448.
- [21] GLARE EM, DIVJAK M, BAILEY MJ, WALTERS EH. Beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels[J]. *Thorax*, 2002, 57(9): 765-770.
- [22] LIU NS, OHNISHI N, NI L, AKIRA S, BACON KB. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells[J]. *Nature Immunology*, 2003, 4: 687-693.
- [23] ZHANG CL, GUI L, XU YJ, WU T, LIU D. Preventive effects of andrographolide on the development of diabetes in autoimmune diabetic NOD mice by inducing immune tolerance[J]. *International Immunopharmacology*, 2013, 16(4): 451-456.
- [24] ZHU M, XU Q, LI XL, HE Q, WANG WF. Modulating effects of leflunomide on the balance of Th17/Treg cells in collageninduced arthritis DBA/1 mice[J]. *Central-European Journal of Immunology*, 2014, 39(2): 152-158.
- [25] ZHONG YC, WANG X, JI QW, MAO XB, TANG HX, YI GW, MENG K, YANG XF, ZENG QT. CD4⁺LAP⁺ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induced by nasal oxidized low-density lipoprotein suppress effector T cells response and attenuate atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice[J]. *Journal of Clinical Immunology*, 2012, 32(5): 1104-1117.
- [26] BAY-RICHTER C, JANELIDZE S, SAURO A, BUCALA R, LIPTON J, DEIERBORG T, BRUNDIN L. Behavioural and neurobiological consequences of macrophage migration inhibitory factor gene deletion in mice[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2015, 12: 163.
- [27] JIN WY, HUANG W, CHEN LQ, JIN MJ, WANG QM, GAO ZG, JIN ZH. Topical application of JAK1/JAK2 inhibitor momelotinib exhibits significant anti-inflammatory responses in DNCB-induced atopic dermatitis model mice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(12): 3973.
- [28] ZHAO SH, YANG YY, LIU W, XUAN ZQ, WU SM, YU SF, MEI K, HUANG YJ, ZHANG P, CAI JM, NI J, ZHAO YX. Protective effect of hydrogen-rich saline against radiation-induced immune dysfunction[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2014, 18(5): 938-946.
- [29] LI HD, ZHANG ZR, ZHANG QX, QIN ZC, HE DM, CHEN JS. Treatment with exogenous hydrogen sulfide attenuates hyperoxia-induced acute lung injury in mice[J]. *European Journal of Applied Physiology*, 2013, 113(6): 1555-1563.
- [30] ZHAO JY, ZHUANG FF, WANG HY, WU D, ZHANG JS. Mx2 plays a critical role in lens epithelium cell cycle control[J]. *International Journal of Ophthalmology*, 2013, 6(3): 276-279.
- [31] RYAN PM, STOLTE EH, LONDON LEE, WELLS JM, LONG SL, JOYCE SA, GAHAN CGM, FITZGERALD GF, ROSS RP, CAPLICE NM, STANTON C. *Lactobacillus mucosae* DPC 6426 as a bile-modifying and immunomodulatory microbe[J]. *BMC Microbiology*, 2019, 19(1): 33.
- [32] CLAY SL, BRAVO-BLAS A, WALL DM, MacLEOD MKL, MILLING SWF. Regulatory T cells control the

- dynamic and site-specific polarization of total CD4 T cells following *Salmonella* infection[J]. Mucosal Immunology, 2020, 13: 946-957.
- [33] TOUCH S, GODEFROY E, ROLHION N, DANNE C, OEUVRAY C, STRAUPE M, GALBERT C, BROU L, ALONSO SALGUEIRO I, CHADI S, LEDENT T, CHATEL JM, LANGELLA P, JOTEREAU F, ALTARE F, SOKOL H. Human CD4⁺CD8 α ⁺ Tregs induced by *Faecalibacterium prausnitzii* protect against intestinal inflammation[J]. JCI Insight, 2022, 7(12): e154722.
- [34] CHEN JJ, XIE L, TOYAMA S, HÜNIG T, TAKAHARA S, LI XK, ZHONG L. The effects of Foxp3-expressing regulatory T cells expanded with CD28 superagonist antibody in DSS-induced mice colitis[J]. International Immunopharmacology, 2011, 11(5): 610-617.
- [35] YANG BH, HAGEMANN S, MAMARELI P, LAUER U, HOFFMANN U, BECKSTETTE M, FÖHSE L, PRINZ I, PEZOLDT J, SUERBAUM S, SPARWASSER T, HAMANN A, FLOESS S, HUEHN J, LOCHNER M. Foxp3(+) T cells expressing ROR γ t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation[J]. Mucosal Immunology, 2016, 9(2): 444-457.
- [36] MORITA H, SHIRATORI C, MURAKAMI M, TAKAMI H, TOH H, KATO Y, NAKAJIMA F, TAKAGI M, AKITA H, MASAOKA T, HATTORI M. *Sharpea azabuensis* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive, strictly anaerobic bacterium isolated from the faeces of thoroughbred horses[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(Pt 12): 2682-2686.
- [37] KAMKE J, KITTELMANN S, SONI P, LI Y, TAVENDALE M, GANESH S, JANSSEN PH, SHI WB, FROULA J, RUBIN EM, ATTWOOD GT. Rumen metagenome and metatranscriptome analyses of low methane yield sheep reveals a *Sharpea*-enriched microbiome characterised by lactic acid formation and utilisation[J]. Microbiome, 2016, 4(1): 56.
- [38] LEVINE UY, BEARSON SMD, STANTON TB. *Mitsuokella jalaludinii* inhibits growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 159(1/2): 115-122.
- [39] BECK BR, SONG JH, PARK BS, KIM D, KWAK JH, DO HK, KIM AR, KIM WJ, SONG SK. Distinct immune tones are established by *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 in the gut of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 55: 434-443.