

研究报告

腹泻犊牛源大肠杆菌对小鼠的致病性

任书男¹, 敖日格乐², 吕文亭¹, 刘佳乐¹, 田艳萍¹, 付鹤¹, 王纯洁^{*1}

1 内蒙古农业大学动物医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018

2 内蒙古农业大学动物科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018

任书男, 敖日格乐, 吕文亭, 刘佳乐, 田艳萍, 付鹤, 王纯洁. 腹泻犊牛源大肠杆菌对小鼠的致病性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 645-658

Ren Shunan, Aorigele, Lü Wenting, Liu Jiale, Tian Yanping, Fu He, Wang Chunjie. Pathogenicity of *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhea to mice[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 645-658

摘要:【背景】建立细菌性动物腹泻模型是研究细菌性腹泻机制及抗腹泻药机理的常用方法。

【目的】从临床腹泻犊牛粪便中分离出 5 株不同血清型大肠杆菌(*Escherichia coli*), 经口灌服小鼠建立与临床犊牛腹泻症状近似的小鼠腹泻模型。【方法】72 只昆明小鼠随机分为 6 组, 每组 12 只, 分为正常对照组(NC)、*E. coli* O1 干预组、*E. coli* O2 干预组、*E. coli* O8 干预组、*E. coli* O78 干预组和 *E. coli* O86 干预组, 攻毒组大肠杆菌浓度均为 3×10^{13} CFU/mL, 每 10 g 体重灌服 0.2 mL 攻毒菌液, 2 次/d, 连续灌服 7 d, 分别于灌服后 3、5 和 7 d 记录小鼠体重及腹泻率, 并收集各组小鼠血清, 检测白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)及第 7 天血清免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、IgA 和分泌型免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A, sIgA)的含量; 于攻毒后第 7 天收集各组小鼠十二指肠及盲肠内容物, 用于制作 HE 切片及 16S rRNA 基因分析; 以 *E. coli* O8 作为攻毒菌株通过灌胃和注射的方法建立腹泻模型, 使用氧氟沙星对腹泻小鼠进行治疗。【结果】攻毒 5 d 和 7 d 后, 各攻毒组小鼠体重与 NC 组比较均显著降低($P < 0.05$), 腹泻率增加; HE 染色结果显示, 各攻毒组小鼠肠绒毛均出现不同程度的损伤, 其中以 *E. coli* O2 和 *E. coli* O8 导致的损伤最为严重, *E. coli* O1 次之; 血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量均显著增加($P < 0.05$), 以 *E. coli* O1 和 *E. coli* O8 的含量增加最为显著; IgG、IgA 和 sIgA 含量显著下降($P < 0.05$), 以 *E. coli* O8 下降最为显著; 小鼠盲肠内容物的 16S rRNA 基因分析显示, 与 NC 组比较各攻毒组小鼠菌群多样性水平降低, 在门水平上攻毒小鼠厚壁菌门 (*Firmicutes*)丰度下降, 拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)和放线菌门 (*Actinobacteria*)丰度上升; 腹腔注射 *E. coli* O8 小鼠在 12 h 内全部死亡, 并且抗生素不能逆转这种死亡, 而通过

基金项目: 国家自然科学基金(31760720); 内蒙古自治区研究生科研创新资助重点项目(BZ2020050)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31760720); Inner Mongolia Autonomous Region Graduate Research Innovation Funding Project (BZ2020050)

*Corresponding author: E-mail: chunjiewang200@sohu.com

Received: 2021-07-16; Accepted: 2021-09-08; Published online: 2021-10-22

灌胃造成的腹泻小鼠经抗生素治疗后可恢复正常。【结论】5株牛源大肠杆菌经口灌服小鼠后均会造成不同程度的腹泻,其中 *E. coli* O2、*E. coli* O8 和 *E. coli* O1 对小鼠肠绒毛破坏较为严重, *E. coli* O8 攻毒后血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量较高,因此,以 0.2 mL/10 g, 2 次/d, 连续灌服 7 d 浓度为 3×10^{13} CFU/mL 的 *E. coli* O8 可较好地建立小鼠腹泻模型,并可用于评价药物疗效。

关键词: 大肠杆菌; 腹泻; IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; 细菌群落

Pathogenicity of *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhea to mice

REN Shunan¹, Aorigele², LÜ Wenting¹, LIU Jiale¹, TIAN Yanping¹, FU He¹,
WANG Chunjie^{*1}

1 College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

2 College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

Abstract: [Background] Establishing the diarrhea model is a common method to study the mechanism of bacterial diarrhea and anti-diarrhea mechanism. [Objective] Five strains of *Escherichia coli* with different serotypes were isolated from the feces of calves with diarrhea. The diarrhea model of mice was established by intragastric administration. [Methods] Kunming mice were randomly divided into six groups: normal control (NC) group, *E. coli* O1, *E. coli* O2, *E. coli* O8, *E. coli* O78, and *E. coli* O86 groups, with 12 mice in each group. The number of *E. coli* in all the challenge groups was 3×10^{13} CFU/mL, and the strain liquid was administrated at 0.2 mL/10 g body weight and twice/day for 7 continuous days. The body weight and diarrhea rate of mice were recorded on days 3, 5 and 7, and the serum samples of mice in each group were collected for the determination of interleukin 1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), immunoglobulin G (IgG), IgA, and secretory immunoglobulin A (sIgA) levels. The duodenum of mice in each group was collected on the 7th day to prepare H&E sections, and the cecum contents were collected for 16S rRNA gene analysis. A diarrhea model was established with *E. coli* O₈ via intragastric or intraperitoneal administration, and ofloxacin was used to treat the mice with diarrhea. [Results] On days 5 and 7, the mice in the *E. coli* groups showed lower body weight ($P<0.05$) and higher diarrhea rate than those in the NC group. HE staining results showed that the intestinal villi of mice in *E. coli* groups showed different degrees of damage, and *E. coli* O2 and O8 caused the most serious damage. The serum levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α significantly elevated after challenge ($P<0.05$), especially in the *E. coli* O1 and O8 groups. However, the levels of IgG, IgA, and sIgA in the challenge groups significantly decreased compared with those in the NC group ($P<0.05$), especially in the group challenged with strain O8. The 16S rRNA gene analysis of cecum contents in mice showed that compared with the NC group, the challenge groups had decreased alpha diversity of bacteria. Specifically, the abundance of *Firmicutes* decreased while that of *Bacteroides*, *Proteobacteria* and *Actinobacteria* increased in the challenge groups. All the mice died within 12 h after intraperitoneal injection with *E. coli* O₈, and antibiotic did not reverse this death, while the mice with diarrhea caused

by intragastric administration could restore to normal after antibiotic treatment. **[Conclusion]** The five strains of *E. coli* from dairy calves with diarrhea could cause different degrees of diarrhea in mice after intragastric administration. Among them, *E. coli* O2, O8, and O1 caused serious damage to the intestinal villi of mice. The serum levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in mice were higher after administration with *E. coli* O8. Therefore, intragastric administration of 3×10^{13} CFU/mL *E. coli* O8 at 0.2 mL/10 g and twice/day for 7 continuous days could well establish the diarrhea model of mice, which can be used to evaluate drug efficacy.

Keywords: *Escherichia coli*; diarrhea; IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; bacterial colony

病原体引起的腹泻包括炎性腹泻和非炎性腹泻^[1],而引起犊牛腹泻的病原体多属炎性腹泻,感染病牛出现体温升高、精神沉郁、水样腹泻及体重下降^[2]等症状。大肠杆菌(*Escherichia coli*)是临床上引起犊牛腹泻常见的病原菌^[3],全年均可发生,尤以1-40日龄犊牛易感,又称犊牛白痢。大肠杆菌表面抗原包括菌体O抗原、表面K抗原和鞭毛H抗原^[4],O抗原是主要毒力因子,与细菌对环境的适应性有关,也是细菌噬菌体和宿主免疫系统的主要识别位点^[5],O抗原血清型有190多种^[6],是菌株鉴定的主要标准^[7],不同致病性大肠杆菌的优势O抗原也不同^[5]。根据不同的致病机理可将大肠杆菌分为产肠毒素性大肠杆菌(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)、肠致病性大肠杆菌(enteropathogenic *E. coli*, EPEC)、肠侵袭性大肠杆菌(enteroinvasive *E. coli*, EIEC)和肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)。其中EPEC常见菌体O抗原血清型包括O1、O2、O18、O78^[8]和O86^[9],ETEC常见菌体O抗原血清型包括O8^[10]等,这些致病菌引起的犊牛腹泻治疗费用高、周期长并使犊牛生长率下降^[11],对我国畜牧养殖业造成巨大的经济损失。因此,腹泻病作为我国重点防治的疾病之一,近年来越来越受到人们的重视。

目前临床常用抗生素治疗腹泻,抗生素造成的耐药性及药物残留等问题危害人类健康,

因而需要寻找天然、无毒害、可替代抗生素治疗腹泻的药物^[12-13]。小鼠腹泻模型是研究药物抗腹泻机制的常用方法。经腹腔注射病原菌建立的腹泻模型首先引起菌血症,进而引起腹泻。然而经消化道感染引起的腹泻主要是由病原微生物定殖于肠道,引起肠道菌群失衡,进而引起炎症反应及腹泻。为了研究出有针对性地治疗细菌性腹泻的药物,需要建立与临床腹泻发病机制相同的腹泻模型。因此,本研究使用由腹泻犊牛粪便分离出的5株不同血清型的*E. coli*作为实验菌株,以昆明小鼠为实验动物,通过苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察小鼠十二指肠的变化情况;酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测小鼠白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)、IgA和分泌型免疫球蛋白A(secretory immunoglobulin A, sIgA)的含量;通过16S rRNA基因测序技术检测小鼠盲肠微生物多样性及菌落构成情况。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

按照内蒙古农业大学兽医学院动物伦理委员会的指导方针进行(编号:[2020]001),72只

21–23 日龄、体重 20–22 g 的无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级昆明小鼠, 雌雄各半, 购自内蒙古医科大学实验动物中心, 呼和浩特[生产编号 SCXK(蒙)2020-0001]。在隔离环境饲养[使用许可证编号 SYXK(蒙)2020-0003], 12 h/12 h 光照周期, 温度(20±2) °C, 相对湿度(45%±10%), 自由进食和饮水。

1.1.2 主要试剂和仪器

SPF 级鼠饲料, 北京维通利华实验动物技术有限公司; 高温煮沸冷却至室温的蒸馏水, 用于饲喂实验动物。

大肠杆菌 O1、O2、O8、O78 和 O86, 由内蒙古农业大学动物科学学院牛生产实验室分离自临床腹泻犊牛^[14], 保存于内蒙古农业大学牛生产实验室。

LB 培养基, 广东环凯微生物科技有限公司, 用于供试病原菌的培养; HE 染液, 碧云天生物技术有限公司; IL-6、IL-1β、TNF-α ELISA 试剂盒, Elabscience 公司; IgG、IgA、sIgA ELISA 试剂盒, 酶联生物科技有限公司; DNA 抽提试剂盒(E.Z.N.A.® Soil DNA Kit), Omega 公司; 凝胶回收试剂盒(AxyPrep DNA Gel Extraction Kit), Axygen Biosciences 公司; 氧氟沙星, 重庆科瑞制药有限公司。

基因测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

酶标仪, 上海迭戈生物科技有限公司; 病理切片机, 上海徠卡仪器有限公司; 组织展片机, 武汉俊杰电子有限公司; 倒置显微镜, Olympus 公司; PCR 扩增仪, ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌的制备

大肠杆菌 O1、O2、O8、O78、O86 分别接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 培养 12 h 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 菌泥

用磷酸盐缓冲液洗 2 次, 调整菌液浓度为 3×10^{13} CFU/mL。

1.2.2 实验动物模型建立

72 只昆明小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为 6 组, 即正常对照组(NC)、*E. coli* O1 干预组(O1)、*E. coli* O2 干预组(O2)、*E. coli* O8 干预组(O8)、*E. coli* O78 干预组(O78)和 *E. coli* O86 干预组(O86), 每组 12 只。NC 组连续灌服生理盐水 7 d, 2 次/d, 攻毒组小鼠以浓度为 3×10^{13} CFU/mL 的 *E. coli* O1、O2、O8、O78 和 O86 灌胃 7 d, 每天记录小鼠腹泻率, 并于第 0、3、5 和 7 天分别记录小鼠体重, 并在灌胃后 3、5 和 7 d 每组以 50 mg/kg 剂量腹腔注射戊巴比妥钠麻醉处死 4 只小鼠, 收集血清, 于第 7 天收集十二指肠及盲肠内容物(图 1)。

腹泻率(%)=一组中排稀便的动物数/该组动物总数×100。

1.2.3 组织病理切片制作

灌胃 3、5 和 7 d 后, 自幽门 1.0–1.5 cm 处开始与空肠交界处收集约 1.0 cm 的十二指肠, 使用 HE 染色方法制作组织病理学切片。组织块用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 石蜡包埋, 切成厚

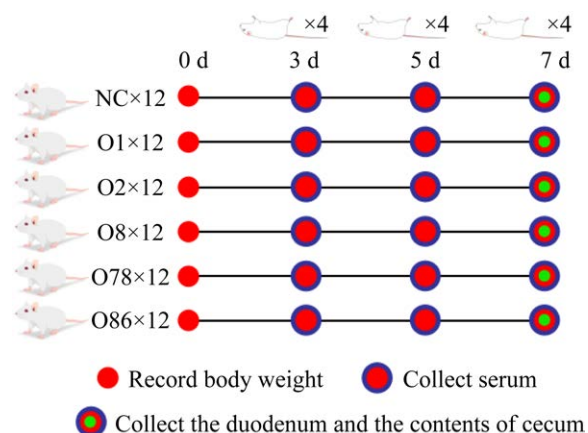


图 1 大肠杆菌攻毒小鼠实验方案

Figure 1 Experiment scheme with *Escherichia coli* intragastrical of mice.

4 μm 的组织切片进行 HE 染色, 光学显微镜下观察。

1.2.4 小鼠血清细胞因子的检测

小鼠灌胃 3、5 和 7 d 后心脏采血, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 后 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清保存于 -20°C 冰箱。使用 ELISA 法检测 3、5 和 7 d 小鼠血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量, 以及第 7 天小鼠血清 IgG、IgA 和小肠组织匀浆 sIgA 的含量。

1.2.5 细菌 DNA 的提取和 16S rRNA 基因序列扩增

小鼠灌胃 7 d 后, 根据 E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit 说明书进行微生物群落总 DNA 抽提, 使用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量, Thermo Scientific NanoDrop 2000 分光光度计测定 DNA 浓度和纯度; 使用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTAC HVGGGTWTCTAAT-3') 对 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 5 \times TransStart *FastPfu* 缓冲液 4 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL , 上、下游引物(5 $\mu\text{mol/L}$)各 0.8 μL , TransStart *FastPfu* DNA 聚合酶(2.5 U/ μL) 0.4 μL , 模板 DNA 10 ng, ddH₂O 补至 20 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 27 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。使用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 进行回收产物纯化, 并用 Quantus[™] Fluorometer 对回收产物进行检测定量。利用 Illumina 公司的 MiSeq PE300/NovaSeq PE250 平台进行测序。

1.2.6 抗生素对不同干预方式所致小鼠腹泻的影响

为了探究药物对不同攻毒途径造成腹泻的影响, 将 24 只昆明小鼠随机分为 3 组, 每组 8 只。正常对照组(NC)灌服 0.9%生理盐水; 灌胃组(intragastric, i.g)以 0.2 mL/10 g 灌服浓度为 3×10^{13} CFU/mL 的 *E. coli* O8 建立腹泻模型; 注

射组(intraperitoneal, i.p)以浓度为 10^5 CFU/mL 的 *E. coli* O8 腹腔注射 50 μL 建立腹泻模型。攻毒组攻毒后均以浓度为 52 mg/kg 的氧氟沙星 300 μL 进行灌胃。NC 组及 i.g 组于灌胃后第 7 天及第 10 天收集小鼠十二指肠, 进行 HE 染色。i.p 组于注射后 12 h 及抗生素干预后第 3 天收集小鼠十二指肠, 进行 HE 染色(图 2)。

1.2.7 数据处理

采用 SPSS 22.0 进行方差分析, 数据用平均数 \pm 标准误差表示, 使用 GraphPad Prism 8.0 进行作图。

2 结果与分析

2.1 小鼠体重及腹泻情况

攻毒 3、5 和 7 d 后的小鼠体重变化情况如图 3 所示。第 0 天和攻毒第 3 天各组小鼠体重差异不显著($P>0.05$); 攻毒第 5 天, 雌鼠 O1、O2、O8 和 O78 组的体重与 NC 组比较差异显著($P<0.05$), O86 组与 NC 组比较差异极显著($P<0.01$), 雄鼠 O2、O8 和 O78 组与 NC 组比较差异显著($P<0.05$); 攻毒第 7 天, 雌鼠 O86 组与 NC 组比较差异极显著($P<0.01$), O78 组与 NC 组比较无显著性差异($P>0.05$), O1、O2 和 O8 组与 NC 组比较均差异显著($P<0.05$), 雄鼠各攻毒组与 NC 组比较均差异显著($P<0.05$)。说明牛源性大肠杆菌 O1、O2、O8、O78 和 O86 长期干预均可使小鼠体重降低(图 3), 并引起小鼠腹泻(图 4), 各组小鼠腹泻率以 O8 组所致的腹泻

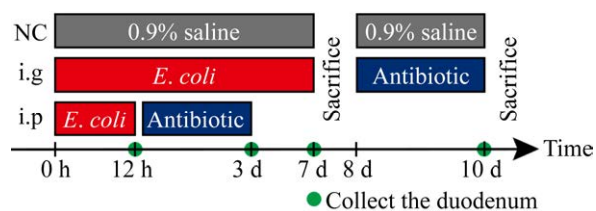


图 2 抗生素治疗腹泻小鼠实验方案

Figure 2 Experiment scheme of antibiotic treatment of diarrhea in mice.

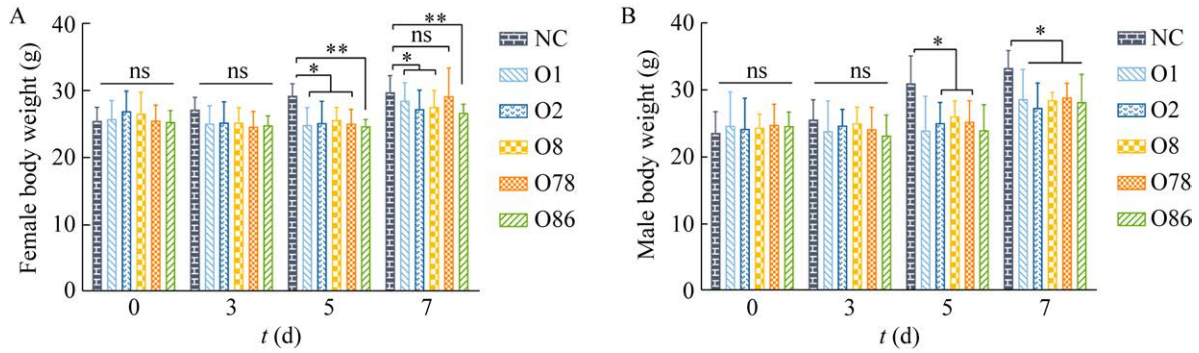


图3 不同组别小鼠体重变化情况

Figure 3 Weight changes of mice in different groups. A: Female body weight; B: Male body weight. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

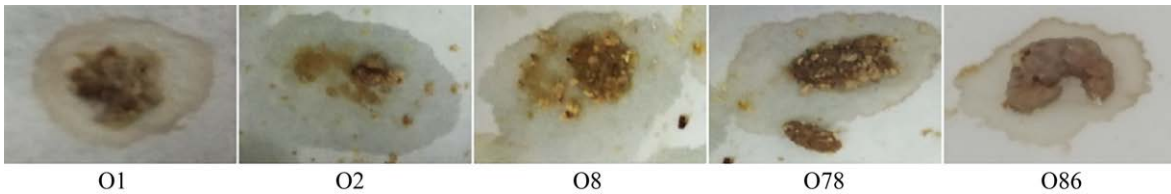


图4 各组小鼠粪便形态

Figure 4 Manure morphology of mice in each groups.

率最高(图 5), 其次为 O2 组和 O1 组血清型, O78 组和 O86 组的腹泻率较低。说明牛源性大肠杆菌 O1、O2 和 O8 造成的腹泻较 O78 和 O86 更为严重。

2.2 十二指肠组织病理学切片

从组织学角度观察不同血清型大肠杆菌攻毒 7 d 后小鼠十二指肠的病理变化(图 6), 结果显示 NC 组肠黏膜固有层绒毛表面有散在的淋巴细胞和浆细胞, 肠黏膜上皮细胞排列整齐, 乳糜管完整, 无病理变化; O1 组小鼠十二指肠绒毛基本完整, 在绒毛顶端出现轻微的损伤; O2 组小鼠肠绒毛顶端损伤较为严重, 出现肠绒毛溶解现象, 绒毛间间隙增宽; O8 组肠绒毛间间隙增宽, 固有层和上皮内淋巴细胞数量增加, 出现中性粒细胞, 肠绒毛受损严重, 肠上皮细胞间紧密连接破坏, 出现轻微水肿; O78 组小鼠肠绒毛间间隙略微增大, 绒毛顶端肠上皮细

胞破碎; O86 组小鼠肠绒毛形态相对完整, 绒毛间间隙未见增大, 绒毛顶端轻微破损。病理学观察说明牛源性大肠杆菌 O1、O2、O8、O78 和 O86 均能造成肠绒毛不同程度的破坏, 但以 O8 及 O2 破坏较为严重, 其次为 O1、O78 和 O86。

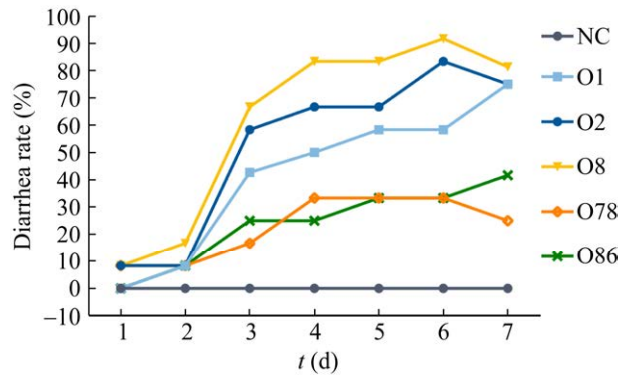


图5 各组小鼠腹泻率

Figure 5 Diarrhea rate of mice in each groups.

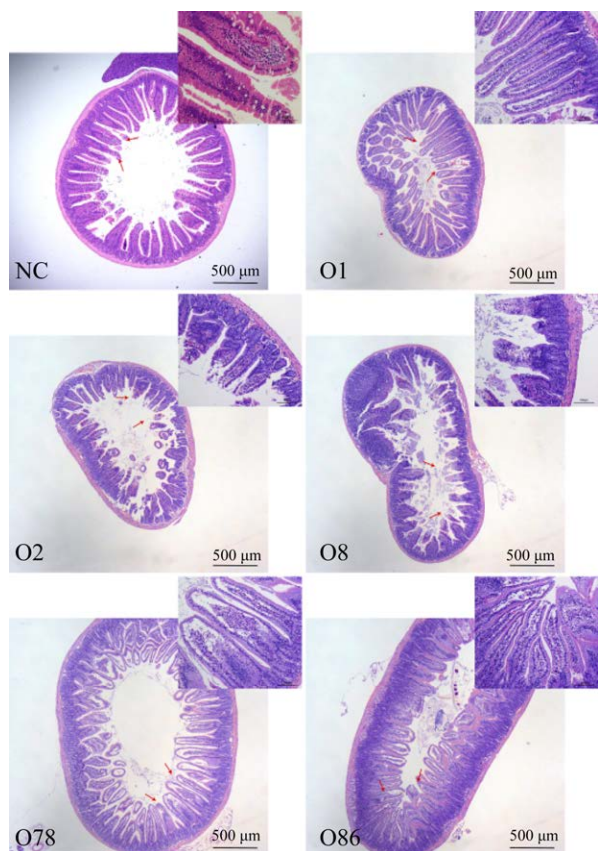


图 6 十二指肠 HE 染色显微图像

Figure 6 HE staining microscopic images of duodenum.

2.3 感染小鼠血清细胞因子及抗体变化

各组小鼠攻毒后血清中细胞因子含量如图 7 所示, 干预后 3 d, O8 组血清中 IL-1 β 极显著高于 NC 组($P<0.01$) (图 7A), 第 5 天 O8 组和 O1 组血清极显著高于 NC 组($P<0.01$) (图 7B), 攻毒 7 d 后(图 7C), 各组血清 IL-1 β 显著高于 NC 组($P<0.05$); 攻毒第 3、5 和 7 天 O8 组血清中 IL-6 的含量极显著高于 NC 组($P<0.01$), 其余各组在检测期间均显著高于 NC 组($P<0.05$) (图 7D、7E、7F); TNF- α 在攻毒后 3 d 和 5 d 均显著高于 NC 组, 第 7 天 O2 组和 O86 组小鼠血清中 TNF- α 的含量与 NC 组比较无显著性差异($P>0.05$) (图 7G、7H、7I); 攻毒 7 d 后, 除 O1 组其余各

组与 NC 组比较 IgG 均差异显著($P<0.05$), IgA 含量与 NC 组比较均显著降低($P<0.05$), 而且 O2 组和 O8 组 sIgA 含量与 NC 组比较极显著降低($P<0.01$) (图 7J)。说明攻毒后各组小鼠均出现炎症反应且抗体水平下降, 其中以 *E. coli* O8 组反应最为明显。

2.4 小鼠盲肠内容物细菌菌落 16S rRNA 基因分析

2.4.1 小鼠盲肠内容物细菌菌落多样性分析

香农指数(Shannon index)、辛普森指数(Simpson index)、Chao1 指数和 ACE 丰富度指数是用于评估物种微生物菌群多样性的指标(表 1), 各组干预 7 d 后, 与 NC 组比较 O1 组 Shannon 指数($P=0.008\ 2$)、Simpson 指数($P=0.001\ 7$)和 ACE 指数($P=0.009\ 2$)均显著降低, Chao1 指数($P=0.159\ 3$)无显著变化; 与 NC 组比较 O2 组 Shannon 指数($P=0.008\ 9$)和 Simpson 指数($P=0.000\ 6$)显著减低, Chao1 指数($P=0.549\ 1$)和 ACE 指数($P=0.092\ 0$)无显著差异; O8 组 Shannon 指数($P=0.038\ 5$)、Simpson 指数($P=0.009\ 0$)和 ACE 指数($P=0.003\ 5$)均显著低于 NC 组, Chao1 指数与 NC 组比较差异不显著($P=0.058\ 4$); O78 组与 NC 组比较 Shannon 指数($P=0.036\ 7$)、Simpson 指数($P=0.000\ 1$)、Chao1 指数($P=0.044\ 2$)、ACE 指数($P=0.009\ 1$)均显著降低; O86 组 Simpson 指数($P=0.000\ 1$)与 NC 组比较显著降低, Shannon 指数($P=0.167\ 4$)、Chao1 指数($P=0.863\ 7$)和 ACE 指数($P=0.166\ 1$)均无显著性变化。说明攻毒后各组小鼠盲肠微生物菌群多样性均降低, 其中以 O1 组、O8 组和 O78 组菌群多样性降低较为明显。

2.4.2 不同干预下小鼠盲肠内容物细菌门水平的菌落丰度

不同牛源性大肠杆菌干预小鼠后, 小鼠盲肠内容物微生物丰度排名前 5 的菌群与 NC 组比较

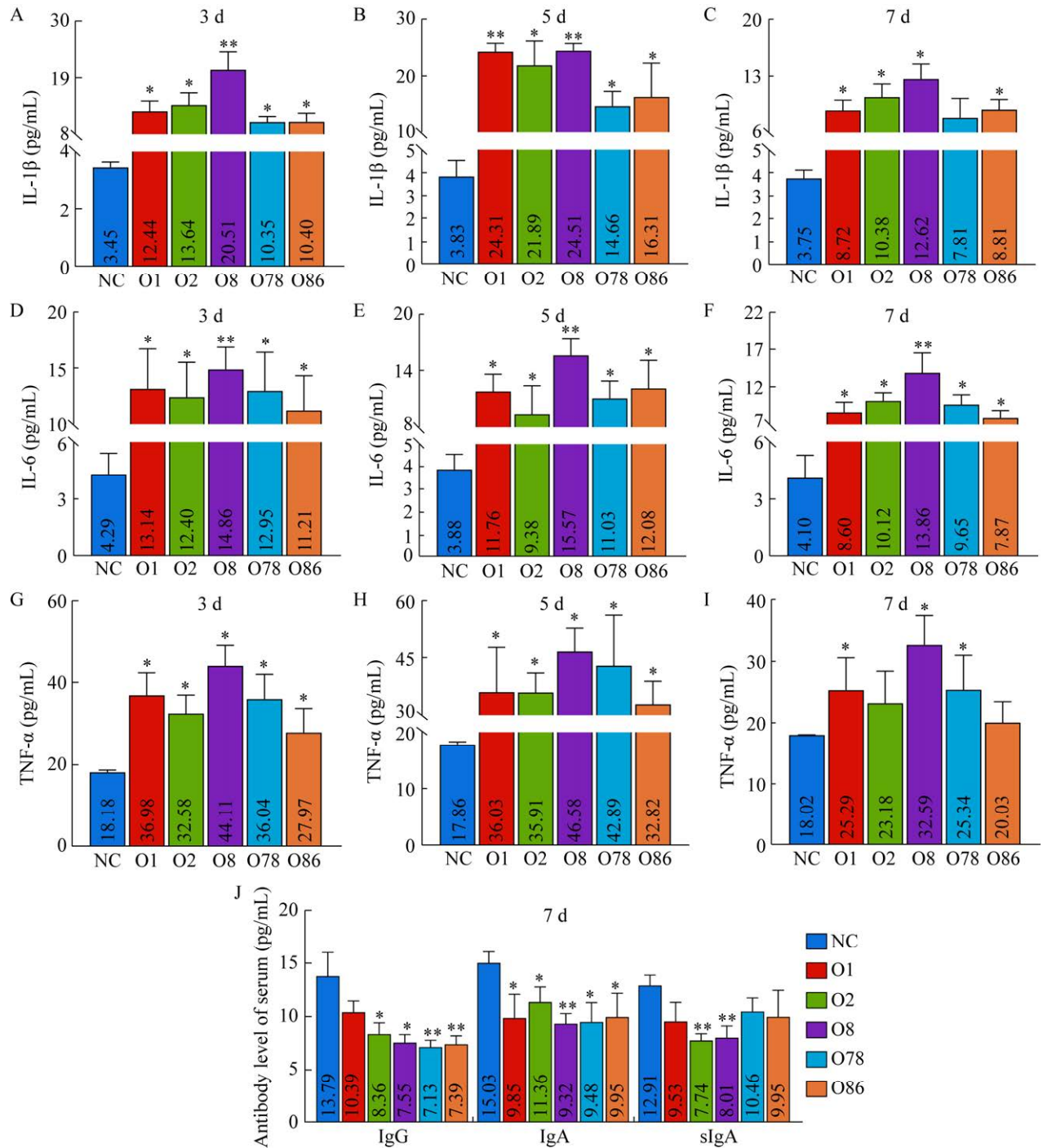


图7 小鼠血清细胞因子及抗体的含量 A、B和C: 攻毒3、5和7 d后小鼠血清中IL-1 β 的含量; D、E和F: 攻毒3、5和7 d后小鼠血清中IL-6的含量; G、H和I: 攻毒3、5和7 d后小鼠血清中TNF- α 的含量; J: 攻毒7 d后小鼠血清IgG、IgA和组织匀浆sIgA的含量。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

Figure 7 The content of cytokines and antibody in mice. A, B and C: *E. coli* administration after 3, 5 and 7 day, the content of IL-1 β in serum; D, E and F: The content of IL-6 in serum at 3, 5 and 7 day; G, H and I: The TNF- α level in serum at 3, 5 and 7 day; J: The level of IgG, IgA in serum and tissue homogenate of sIgA. Compared with NC group. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

表 1 盲肠内容物 α 多样性

Table 1 Alpha diversity of microbes in the caecum

Group	Shannon index	Simpson index	Chao1 index	ACE index
NC	4.44±0.39a	0.14±0.02a	427.82±63.27a	441.25±47.93a
O1	3.23±0.49b	0.06±0.02b	338.51±49.99ab	299.33±57.89b
O2	2.88±0.72b	0.05±0.02b	403.36±44.09ac	378.68±41.23ac
O8	3.18±0.87b	0.05±0.02b	290.05±54.60b	283.64±47.99b
O78	3.21±0.83b	0.04±0.01b	332.74±40.26b	340.55±23.11b
O86	3.87±0.62a	0.04±0.01b	420.04±59.95ac	398.10±26.33ac

注: 同一列相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$); 不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)

Note: The values with the same lowercase letters superscripts mean no significant difference ($P>0.05$); while with different lowercase letters superscripts mean significant difference ($P<0.05$).

均出现显著变化(表 2)。在门水平上, 厚壁菌门中与 NC 组比较 O1 组($P<0.000 1$)、O2 组($P<0.000 1$)、O8 组($P<0.000 1$)、O78 组($P<0.000 1$)、O86 组($P=0.001 1$)的丰富度均降低; 在拟杆菌门中与 NC 组比较 O1 组($P=0.000 4$)、O2 组($P<0.000 1$)、O8 组($P<0.000 1$)、O78 组($P=0.000 5$)、O86 组($P=0.000 4$)的丰度均升高; 在变形菌门中与 NC 组比较 O1 组($P<0.000 1$)、O2 组($P<0.000 1$)、O8 组($P<0.000 1$)、O78 组($P=0.000 3$)、O86 组($P=0.001 2$)的丰富度均升高; 在放线菌门中与 NC 组比较 O1 组($P<0.000 1$)、O2 组($P=0.001 1$)、O8 组($P=0.000 4$)、O78 组($P=0.004 8$)、O86 组($P=0.009 1$)的丰富度均升高。小鼠盲肠内容物分析显示 NC 组小鼠盲肠内容物厚壁菌门及拟杆菌门含量较高, 其次为变形菌门和放线菌门, 而

经过牛源性大肠杆菌 O1、O2、O8、O78 和 O86 以 3×10^{13} CFU/mL 灌服后的小鼠肠道菌群水平发生了变化, 攻毒后的小鼠均出现厚壁菌门(*Firmicutes*)丰富度降低, 拟杆菌门(*Bacteroides*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)丰富度的升高。

2.5 抗生素对小鼠灌服或注射 *E. coli* O8 的影响

剖检正常小鼠小肠, 各肠段组织形态完整, 肠蠕动明显, 无充血现象(图 8A、8B), HE 染色显示肠上皮细胞排列整齐, 肠绒毛形态完整(图 9A、9B); 灌胃 *E. coli* O8 7 d, 剖检小肠各段, 有轻微肿胀, 肠蠕动明显(图 8C、8D), 病理学切片显示肠绒毛顶端的肠上皮细胞破坏, 有大量中性粒细胞分泌(图 9C), 经抗生素治疗

表 2 小鼠盲肠微生物丰富度

Table 2 Microbial abundances in caecum of mice

Group	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
NC	71.72±2.97a	21.75±1.59a	0.25±0.06a	1.02±0.10a
O1	41.43±5.43b	43.06±5.85b	3.50±0.38b	4.84±0.69b
O2	34.76±3.99b	50.02±1.95b	3.89±0.45b	3.15±0.72b
O8	37.35±2.17b	47.10±2.28b	4.22±0.45b	5.90±1.39b
O78	38.44±3.21b	44.85±6.18b	6.93±1.76b	6.18±2.36b
O86	50.35±6.65b	37.47±4.38b	4.06±1.33b	3.83±1.48b

注: 相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$); 不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)

Note: The values with the same lowercase letters superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different lowercase letters superscripts mean significant difference ($P<0.05$).

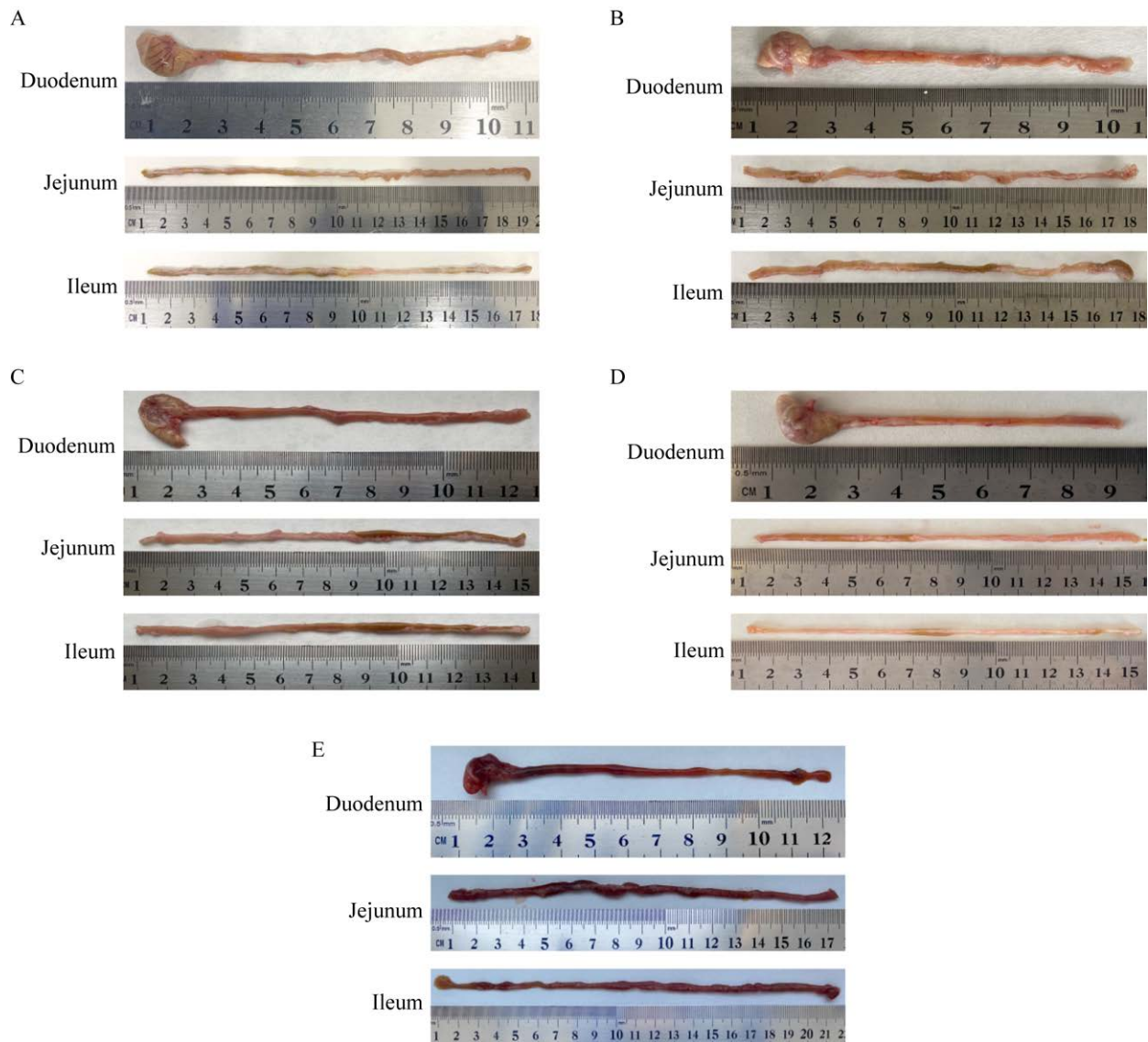


图 8 小肠组织病理变化 A 和 B: NC 组小鼠第 7 天和第 10 天十二指肠、空肠和回肠组织形态; C: 灌胃 7 d 后小鼠十二指肠、空肠和回肠组织形态变化; D: 灌胃后, 抗生素干预 3 d 后小肠组织形态变化; E: 腹腔注射 12 h 后小肠组织形态变化

Figure 8 Pathological changes of small intestine. A and B: The tissue morphology of duodenum, jejunum and ileum at day 7 and 10 from NC group; C: The tissue morphology of duodenum, jejunum and ileum at day 7 after *E. coli* O8 intragastric administrate; D: The small intestine morphology at day 10 after antibiotic administrate; E: The small intestine morphology after intraperitoneal injection.

3 d 后, 肠绒毛形态基本完整, 中性粒细胞数量减少(图 9D); 腹腔注射 *E. coli* O8 12 h 后, 小鼠均发生死亡, 死亡率达 100%, 小鼠眼周红肿并伴有脓性分泌物, 剖检小鼠各段小肠

发现小肠明显充血且肠蠕动消失(图 8E), HE 染色观察小肠黏膜下层增厚、结缔组织增多、血管充血、小肠腺间隙增宽、中性粒细胞增多。

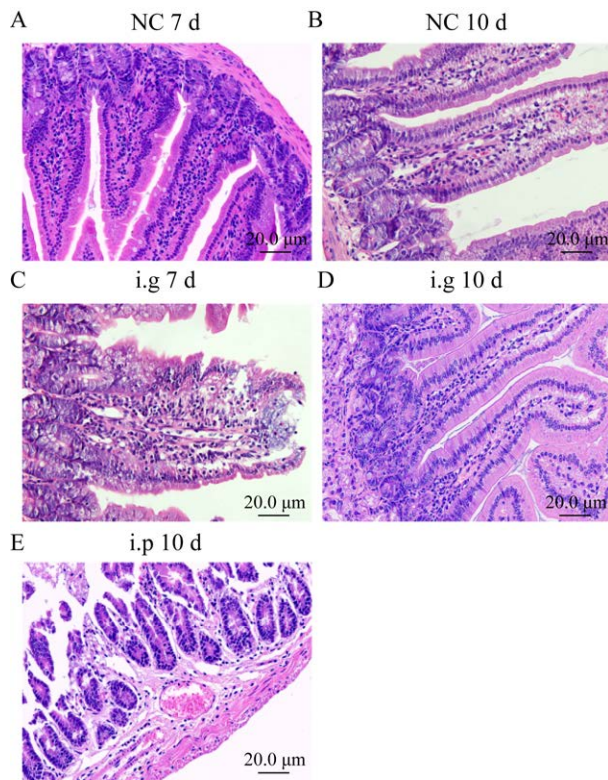


图 9 十二指肠组织病理切片 A 和 B: 正常组第 7 天和第 10 天十二指肠 HE 染色; C: 灌胃组 *E. coli* O8 灌胃 7 d 后十二指肠 HE 染色; D: *E. coli* 干预 7 d, 抗生素干预 3 d 后十二指肠 HE 染色; E: 腹腔注射 *E. coli* O8 后 12 H 十二指肠 HE 染色

Figure 9 HE staining microscopic images of duodenum. A and B: HE staining of duodenum tissues from NC groups at day 7 and 10; C: HE staining of duodenum tissue from i.g group after *E. coli* O8 administrate; D: HE staining of duodenum tissue after antibiotic administrate; E: HE staining of duodenum tissue from i.p group at 12 hours after *E. coli* O8 intraperitoneal injection.

3 讨论与结论

大肠杆菌是动物肠道内正常菌群之一,可分为致病性和非致病性两类。ETEC 是造成犊牛腹泻常见的病原菌,哺乳动物对 ETEC 均易感^[15],感染动物表现为腹泻和脱水。ETEC 的主要毒

力因子是黏附素和肠毒素^[16],其进入宿主体内后由定居因子黏附于小肠上皮细胞^[17]产生耐热性肠毒素(heat-stable enterotoxin, ST)和不耐热性肠毒素(heat-labile enterotoxin, LT)^[18],使肠绒毛发生形态变化^[7],除此之外, *E. coli* O₈还能产生志贺毒素^[19]引起新生犊牛严重腹泻^[20]。研究表明,引起小鼠腹泻的大肠杆菌浓度约为 10^8 CFU/mL^[21],本研究中大肠杆菌浓度调至 3×10^{13} CFU/mL,结果表明属于 ETEC 主要致病血清型之一的 *E. coli* O8^[22]能成功建立小鼠腹泻模型,攻毒小鼠出现腹泻症状,连续干预 5 d 后小鼠体重下降、腹泻率增加,十二指肠肠绒毛破坏,间隙增宽,出现炎性细胞浸润,与陈清等使用 ETEC 感染豚鼠建立的腹泻模型结果一致^[17]。

细胞因子是一类由机体免疫细胞和非免疫细胞合成分泌的小分子多肽类物质,可以调节多种细胞功能^[23]。促炎性细胞因子包括 IL-6、IL-1 和 TNF 等。IL-6 在发生炎症时含量上升,其升高与巨噬细胞、淋巴细胞、单核细胞有关,可进一步诱导免疫应答^[24],并由 IL-1 β 诱导^[24]; IL-1 β 是 IL-1 家族细胞因子的一员,能抑制肠道 Na 和 K-ATP 酶的活性,进而抑制水、钠吸收,产生腹泻^[25-27];受到病原微生物感染,血清 TNF- α 含量上升,进而加重肠道损伤程度,发生黏膜炎性反应^[28]。IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 有较强的致炎活性,使肠黏膜通透性增加,渗出增多,发生腹泻^[29]。本研究中攻毒小鼠血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量均显著上升,说明 *E. coli* 感染后触发了机体的炎症反应,而且使血清中 IgA、IgG 和 sIgA 的含量下降。

正常小鼠盲肠微生物主要以拟杆菌门和厚壁菌门为主^[30],初生犊牛瘤胃中菌群数量以拟杆菌门为主,其次为厚壁菌门,这样的结构有助于非纤维物质的消化,随着犊牛的生长,瘤胃中拟杆菌门数量减少,厚壁菌门数量增加^[31]。拟

杆菌门有助于从膳食纤维和淀粉中释放能量,并可能产生丙酸盐^[32],然而,它们也参与了蛋白质分解过程中有毒产物的释放,拟杆菌门的一些成员可能抑制炎症,但有一些也可能会促进炎症。在体外研究中,轻度偏酸性环境下厚壁菌门为优势菌,而在接近中性水平时拟杆菌为优势菌^[33]。在本研究中,正常小鼠优势菌门为厚壁菌门和拟杆菌门,致病性大肠杆菌干预后小鼠盲肠厚壁菌门含量下降,同时拟杆菌门、变形菌门和放线菌门含量上升,提示攻毒后小鼠肠道pH值可能降低,进而促进拟杆菌门的丰度增加;正常情况下变形菌门的丰度次于厚壁菌门和拟杆菌门,变形菌门包括许多病原菌,例如大肠杆菌,可造成动物机体损伤。研究发现出生小鼠肠道变形菌门能诱导特异性免疫应答^[34],在本研究中,*E. coli*干预后变形菌门及血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的含量均显著升高,一定程度上说明变形菌门与血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的含量呈正相关,与厚壁菌门呈负相关,说明*E. coli*造成的腹泻与变形菌门和拟杆菌门的增加和厚壁菌门的减少有关,可能通过增加变形菌门的丰度促进炎症的发生。

犊牛腹泻造成的经济损失、临床抗生素的滥用、食品安全等一系列问题一直是畜牧养殖行业关注的热点,并且越来越多的研究指向用无毒害的天然药物代替抗生素治疗犊牛腹泻。大量研究表明,细菌性腹泻的致病机理分为3个阶段:细菌黏附与定殖、胃黏液分泌增加与毒素释放^[1],在通过腹腔注射建立的小鼠模型中,细菌首先进入腹腔,进而造成了腹泻,与经口进入消化系统,定殖于肠道,干扰肠道菌群造成腹泻的方式不同,因而虽然腹腔注射与灌胃均可造成腹泻,但灌胃造成的腹泻更能代表临床感染途径,因此,良好的动物腹泻模型能给研究奠定坚实的基础。本研究表明,分离出的5株牛源性大肠杆菌均可

造成小鼠腹泻症状,并对肠黏膜造成损伤,但以*E. coli* O8造成的腹泻模型与犊牛临床腹泻症状最为相似,肠绒毛上皮细胞破坏严重,盲肠内容物致病菌群数量增加,从而产生炎症反应。本研究为评价腹泻药物提供了一种可行的模型。

REFERENCES

- [1] Navaneethan U, Giannella RA. Mechanisms of infectious diarrhea[J]. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology, 2008, 5(11): 637-647
- [2] 韩玉文, 李子佳, 于文会, 王娜, 姜晓文, 郝敬友. 复方诃子口服液抗犊牛大肠杆菌性腹泻的药理作用研究[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(1): 305-312
Han YW, Li ZJ, Yu WH, Wang N, Jiang XW, Hao JY. Studies on the pharmacological effects of compound myrobalan oral liquid against *Escherichia coli* diarrhea in calves[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(1): 305-312 (in Chinese)
- [3] 严勇, 李新圃, 武小虎, 丁学智, 严作廷, 王胜义, 李宏胜, 王旭荣. 牛源大肠杆菌研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(5): 35-41
Yan Y, Li XP, Wu XH, Ding XZ, Yan ZT, Wang SY, Li HS, Wang XR. Advances in *Escherichia coli* of bovine origin[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2020, 39(5): 35-41 (in Chinese)
- [4] Kauffmann F. The serology of the coli group[J]. Journal of Immunology, 1947, 57(1): 71-100
- [5] 刘璨颖, 张济培, 王丙云. 大肠杆菌 O-抗原血清型鉴定研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(10): 928-933
Liu CY, Zhang JP, Wang BY. Research progress on identification of *Escherichia coli* O-antigen serogroups[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2016, 32(10): 928-933 (in Chinese)
- [6] 朱红, 李妍, 魏娟文, 张耀东, 王瑶, 陶程琳, AFAYIBO Dossêh Jean Apôtre, 李涛, 祁晶晶, 田明星, 等. 鉴别大肠杆菌 O8/O9 血清型双重 PCR 方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2021, 51(5): 569-574
Zhu H, Li Y, Wei JW, Zhang YD, Wang Y, Tao CL, Apôtre A, Li T, Qi JJ, Tian MX, et al. Establishment of duplex PCR method for detection of *Escherichia coli* O8 and O9 serotypes[J]. Chinese Veterinary Science, 2021, 51(5): 569-574 (in Chinese)
- [7] Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*[J].

- Bacteriological Reviews, 1977, 41(3): 667-710
- [8] 王瑶, 张耀东, 易正飞, 信素华, 陶程琳, 李妍, 李涛, 祁晶晶, 田明星, 丁铲, 等. 禽致病性大肠杆菌血清型、进化分群及毒力基因的分子流行病学调查[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(9): 1159-1166
Wang Y, Zhang YD, Yi ZF, Xin SH, Tao CL, Li Y, Li T, Qi JJ, Tian MX, Ding C, et al. Molecular epidemiological investigation on serotype, phylogenetic group and virulence genes of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(9): 1159-1166 (in Chinese)
- [9] 权太淑, 李薇, 李乐民, 范天锐. 122 株肠致病性大肠杆菌的血清型、生物型和噬菌体型分型的实验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 1994, 4(6): 343-347
Quan TS, Li W, Li YM, Fan TR. Experimental study on serotype, biotype and phage type of 122 enteropathogenic *Escherichia coli* strains[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 1994, 4(6): 343-347 (in Chinese)
- [10] 张赛奇, 王米, 雷娜, 杨锐乐, 薛飞群. 中药对猪源大肠杆菌 O8 体外抑菌试验研究[J]. 家畜生态学报, 2015, 36(8): 62-65
Zhang SQ, Wang M, Lei N, Yang RL, Xue FQ. Antibacterial sensitivity of Chinese herbal medicine against swine *Escherichia coli* O8 *in vitro*[J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2015, 36(8): 62-65 (in Chinese)
- [11] Bonelli F, Turini L, Paganelli A, Conte G, Meucci V, Sgorbini M, Buccioni A, Mele M. Evaluation of oral administration of chestnut tannins in preventing calf diarrhoea[J]. Italian Journal of Animal Science, 2021, 20(1): 640-649
- [12] 赵凯科, 韩军艳, 郑立, 刘太宇. 葎草醇提取物对小鼠细菌性腹泻的治疗作用[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(11): 1814-1818, 1823
Zhao KK, Han JY, Zheng L, Liu TY. Therapeutic effect on *Humulus scandens* alcohol extract on bacterial diarrhea of mice[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35(11): 1814-1818, 1823 (in Chinese)
- [13] Lai HH, Chiu CH, Kong MS, Chang CJ, Chen CC. Probiotic *Lactobacillus casei*: effective for managing childhood diarrhea by altering gut microbiota and attenuating fecal inflammatory markers[J]. Nutrients, 2019, 11(5): 1150
- [14] 杨斯琴, 敖日格乐, 王纯洁, 斯木吉德, 包永光. 蒙药对牛源致病性大肠杆菌的体外抑菌效果研究[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(1): 124-128
Yang SQ, Ao R, Wang CJ, Si M, Bao YG. Antibacterial effects of Mongolian medicines on bovine pathogenic *Escherichia coli in vitro*[J]. Journal of China Agricultural University, 2015, 20(1): 124-128 (in Chinese)
- [15] Lin Q, Su GQ, Wu AM, Chen DW, Yu B, Huang ZQ, Luo YH, Mao XB, Zheng P, Yu J, et al. Bombyx mori gloverin A2 alleviates enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced inflammation and intestinal mucosa disruption[J]. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2019, 8: 189
- [16] Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2005, 295(6): 443-454
- [17] 陈清, 俞守义, 申洪, 王雅贤, 吴敏. 产毒性大肠杆菌的致病机制[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(8): 826-829
Chen Q, Yu SY, Shen H, Wang YX, Wu M. Pathogenic mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* in Guinea pigs[J]. Journal of First Military Medical University, 2003, 23(8): 826-829 (in Chinese)
- [18] 张雪寒, 何孔旺, 张书霞. 产肠毒素性大肠杆菌肠毒素的研究概况[J]. 动物医学进展, 2003, 24(3): 38-40
Zhang XH, He KW, Zhang SX. Research survey of enterotoxin in enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2003, 24(3): 38-40 (in Chinese)
- [19] Beutin L, Strauch E. Identification of sequence diversity in the *Escherichia coli fliC* genes encoding flagellar types H8 and H40 and its use in typing of shiga toxin-producing *E. coli* O8, O22, O111, O174, and O179 strains[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(2): 333-339
- [20] 朱晶. 产肠毒素大肠杆菌、肠上皮细胞和乳酸菌相互关系的研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2011
Zhu J. Studies on interactions between enterotoxigenic *Escherichia coli*, intestinal epithelial cells and lactic acid bacteria[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiaotong University, 2011 (in Chinese)
- [21] 雷姚攀. 急性细菌性腹泻致病机理研究的进展[J]. 人民军医, 1983, 26(8): 64-66
Lei YP. Advances in the study of the pathogenic mechanism of acute bacterial diarrhea[J]. People's Military Surgeon, 1983, 26(8): 64-66 (in Chinese)
- [22] Hanevik K, Chen WH, Talaat KR, Porter C, Bourgeois L. The way forward for ETEC controlled human infection models (CHIMs)[J]. Vaccine, 2019, 37(34): 4794-4799
- [23] 李秋月, 许海玉, 杨洪军. 促炎因子 TNF- α , IL-1 β ,

- IL-6 在神经病理性疼痛中的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3709-3712
- Li QY, Xu HY, Yang HJ. Effect of proinflammatory factors TNF- α , IL-1 β , IL-6 on neuropathic pain[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(19): 3709-3712 (in Chinese)
- [24] 罗诗雨, 税典奎, 陈峭, 叶剑, 蒋应玲, 梁谊深, 宁庆云, 覃凌娜. 附子理中汤合四神丸治疗腹泻型肠易激综合征(脾肾阳虚证)的临床疗效及对患者血清 TNF- α 、IL-6、IL-8 的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(9): 1915-1918
- Luo SY, Shui DK, Chen Q, Ye J, Jiang YL, Liang YS, Ning QY, Qin LN. Clinical effect of fuzi lizhong decoction combined with sishen pill in treatment of diarrhea-type irritable bowel syndrome (spleen and kidney deficiency syndrome) and its effect on serum TNF- α , IL-6 and IL-8[J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, 46(9): 1915-1918 (in Chinese)
- [25] 李倩楠, 葛晓群. 黄芩苷的解热作用及对细胞因子的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8): 1068-1072
- Li QN, Ge XQ. Effect of baicalin on antipyresis and influence on cytokine[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(8): 1068-1072 (in Chinese)
- [26] 胡俊, 胡团敏, 何文钦, 黄永德. 黄术灌肠液对腹泻型肠易激综合征大鼠 IL-1 β 、IL-10 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(21): 2188-2191
- Hu J, Hu TM, He WQ, Huang YD. Effects of Huangshu Enema on the levels of serum IL-1 β and IL-10 in rats with diarrhea predominant irritable bowel syndrome[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2009, 17(21): 2188-2191 (in Chinese)
- [27] 何亚伦, 彭浩. 解毒健脾方对腹泻型肠易激综合征大鼠 IL-1 β 、IL-10 表达的影响[J]. 江西中医药, 2017, 48(4): 32-34
- He YL, Peng H. Effect of Jiedu Jianpi Recipe on IL-1 β and IL-10 expression in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats[J]. Jiangxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 48(4): 32-34 (in Chinese)
- [28] Papadakis KA, Targan SR. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors[J]. Gastroenterology, 2000, 119(4): 1148-1157
- [29] 姜丽霞. 细菌和病毒感染性腹泻患儿 IL-1、IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平观察[J]. 检验医学, 2006, 21(1): 88
- Jiang LX. Observation of IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α levels in children with bacterial and viral infectious diarrhea[J]. Laboratory Medicine, 2006, 21(1): 88 (in Chinese)
- [30] Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breast-and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH)[J]. Anaerobe, 2011, 17(6): 478-482
- [31] 陈凤梅, 程光民, 张永翠, 郭建强, 牛钟相, 胡士林. 复合微生态制剂对哺乳期犊牛生长性能及瘤胃微生态区系的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(7): 3234-3245
- Chen FM, Cheng GM, Zhang YC, Guo JQ, Niu ZX, Hu SL. Effects of compound microecologies on growth performance and rumen microbiota of calves in lactation period[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(7): 3234-3245 (in Chinese)
- [32] Krautkramer KA, Fan J, Bäckhed F. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(2): 77-94
- [33] Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(8): 2112-2122
- [34] Mirpuri J, Raetz M, Sturge CR, Wilhelm CL, Benson A, Savani RC, Hooper LV, Yarovinsky F. Proteobacteria-specific IgA regulates maturation of the intestinal microbiota[J]. Gut Microbes, 2014, 5(1): 28-39