



小鼠粪便及肠道各部位内容物细菌群落结构差异分析

武亚琦¹, 钟根深², 吴敏娜^{1*}

(1. 新乡医学院基础医学院, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院第一附属医院, 河南 卫辉 453100)

【摘要】 目的 分析小鼠粪便及肠道各部位内容物细菌群落结构差异, 探讨粪便取样研究肠道微生物与疾病关系的科学性和客观性, 为相关实验设计提供参考。方法 利用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)和荧光定量PCR(qPCR)技术对BALB/c小鼠肠道不同部位(十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和直肠)内容物及粪便中细菌群落组成和丰度进行比较, 分析细菌群落在小鼠粪便及肠道各部位的分布差异。结果 粪便与直肠、结肠中优势片段均为244、255 bp和449 bp, 而小肠内容物(十二指肠、空肠及回肠)的优势片段则为60、73、261、268 bp和272 bp, 且小肠各部位之间细菌群落结构差异较大; 十二指肠和空肠内容物中的细菌丰度较低, 分别为 $6.9 \log(\text{copies})/\text{g}$ 和 $8.3 \log(\text{copies})/\text{g}$, 而粪便中细菌丰度高达 $11.8 \log(\text{copies})/\text{g}$, 约2倍于十二指肠细菌丰度, 显著高于十二指肠和空肠($P < 0.05$), 与大肠各部位及回肠内容物细菌丰度相当, 差异不显著($P > 0.05$)。结论 大肠各部位内容物和粪便的细菌群落结构相似, 个体差异较小肠小, 适合通过粪便取样进行大肠部位特别是结直肠的肠道微生态与某些疾病的相关分析。

【关键词】 末端限制性片段长度多态性; 变性梯度凝胶电泳; 荧光定量PCR, 小鼠; 肠道微生态

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)03-0249-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.006

Differential analysis of the bacterial community composition in mouse feces and intestinal contents

WU Ya-qi¹, ZHONG Gen-shen², WU Min-na^{1*}

(1. Basic Medical School of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China;

2. the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100)

【Abstract】 **Objective** To explore the objectivity and scientificity of fecal sampling, and to provide reference for investigating the relationship between intestinal microbes and diseases. **Methods** Terminal restriction fragment length polymorphism, degeneration gradient gel electrophoresis and real time fluorescent quantitative PCR techniques were applied to differentially analyze the bacterial community composition and abundance of intestinal contents and feces taken from different sites of BALB/c mouse intestine. **Results** The predominant T-RFLP fragments (T-RFs) in feces in the rectum and colon were 244 bp, 255 bp and 449 bp, however, those in feces of the small intestine including duodenum, jejunum and ileum were 60 bp, 73 bp, 261 bp, 268 bp and 272 bp, and with a larger variation of the bacterial community composition in various parts of the small intestine. The bacterial abundance in the contents of duodenum and jejunum were $6.9 \log(\text{copies})/\text{g}$ and $8.3 \log(\text{copies})/\text{g}$, fewer than in the other parts of the intestine, while the bacterial abundance in the feces was as high as $11.8 \log(\text{copies})/\text{g}$, being about 2 times higher than that in the duodenum and jejunum ($P < 0.05$), and similar to that in the ileum and colon content ($P > 0.05$). **Conclusions** The inter-mouse variations of bacterial community composition in the large intestine contents are small. The bacterial composition and abundance are similar suggest that

[基金项目] 国家自然科学基金(40901125,81201765);新乡医学院科研培育基金(2013ZD102)。

[作者简介] 武亚琦(1989-),男,硕士研究生,专业:病原生物学。E-mail: yaqiwww@163.com。

[通讯作者] 吴敏娜(1981-),女,副教授,硕士生导师,研究方向:肠道微生态。E-mail: minnawu@xxmu.edu.cn。

studies on the relationship between large intestine especially colorectal microbiota and diseases may be conducted via fecal sampling.

【Key words】 Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP); Degeneration gradient gel electrophoresis (DGGE); Real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR); Mouse; Intestinal microbiota

肠道中含有数量巨大的微生物,数量超过 10^{14} , 约 10 倍于人体细胞^[1]。这些微生物在维持人类生命健康方面发挥着重要作用^[2]。近来研究发现肠道微生物与炎性肠病 (IBD)、结直肠癌 (CRC)、肥胖、二型糖尿病等多种疾病密切相关^[3-6]。因此,加强对肠道微生态的了解有助于对一些肠道疾病的诊断及治疗。

肠道微生物群的检测方法众多,通过粪便中微生物的群落结构来反映肠道微生态是许多研究人员选用的方法^[7,8]。然而,遗传、肠道内外部环境因素造成肠道各部位及个体之间肠道微生物群落组成的差异^[9]。因此粪便是否可真实反映肠道微生态还有待进一步探讨。本文利用末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP)、变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 和荧光定量 PCR (qPCR) 技术,通过比较同龄雄性 BALB/c 小鼠粪便和肠道不同部位内容物中微生物群落结构和丰度的差异,分析粪便取样研究肠道微生物与某些相关疾病的科学性和客观性,为相关实验设计提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物饲养及取样

SPF 级 BALB/c 雄性小鼠,12 周龄,体重均为 24g 左右,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】,饲养于华兰生物工程股份有限公司 SPF 级实验室【SYXK(豫)2012-0003】。SPF 级饲料购自北京科澳协力饲料有限公司,室温 (22 ± 2) °C,相对湿度为 30% ~ 40%,采用日光灯照明,12 h 明/12 h 暗,自由饮用纯净水,适应性饲养 1d 后在无菌环境中收集粪便于 2 mL EP 管中,然后处死小鼠并解剖取出从幽门至肛门小鼠整个肠道。根据肠道解剖学特征依次截取相应的部位,剪开肠段,用无菌手术刀刮取内容物,置于 2 mL EP 管中,立即放入 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.2 细菌基因组 DNA 的提取

采用 Tiangen 粪便 DNA 提取试剂盒 (DP328, Tiangen) 进行粪便及肠道内容物中细菌基因组 DNA 的提取,按说明书进行操作。然后用紫外分光光度计 (Nano Drop 2000, Thermo, USA) 测定所提取 DNA

的浓度。

1.3 普通 PCR 扩增与产物的纯化

采用细菌 16S rDNA 特异性引物 8F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[10] 对样品中的目的基因进行 PCR 扩增,其中引物 8F 的 5' 端带有 FAM 标记。PCR 扩增试剂购自宝生物工程有限公司 (大连),扩增体系和程序按参考文献进行^[10]。然后将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,严格按照琼脂糖凝胶回收试剂盒 (DP214, Tiangen) 说明书操作纯化 PCR 产物。

1.4 T-RFLP 分析

采用限制性内切酶 *Alu I* (宝生物工程有限公司,大连) 对纯化后的 PCR 产物进行酶切,酶切反应体系为: *Alu I* 1 μ L (10 U), 10 \times buffer 2 μ L, 17 μ L 纯化后的 PCR 产物,共 20 μ L,混匀后在 37 °C 恒温条件下酶切 4 h,然后于 80 °C 水浴 20 min 使酶失活,最后将酶切产物低温快递送至上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.5 DGGE 分析

用细菌 16S rDNA V3 区特异性引物 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')^[11] 对粪便细菌基因组进行扩增,PCR 体系和程序据参考文献进行^[12]。制备 8% 浓度、变性范围为 35% ~ 55% 的聚丙烯酰胺凝胶,保持 60 °C 恒温,在 60 V 恒压下电泳 16h。电泳结束后,使用 EB 染色 25 min,然后在凝胶成像系统 (EC3, UVP, USA) 下成像。

1.6 荧光定量 PCR

用 pMDTM18-T 载体连接试剂盒和感受态大肠杆菌 DH-5 α (宝生物,大连) 构建含 16S rDNA V3 区 341-518 片段的质粒,选取 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^5$ copies/ μ L 这 5 个浓度的质粒作为标准品,每个标准品设 3 个重复,在荧光定量 PCR 仪 (Step One PlusTM, ABI, USA) 中生成标准曲线。

对样品 DNA 进行 qPCR,反应体系为: SYBR premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10 μ L,引物 341F 和 518R 均为 0.4 μ L, ROX reference dye (50 \times) 0.4 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 6.8 μ L, 共

20 μL。荧光定量反应体系为:95 °C 30 s,1 个循环;95 °C 5 s,60 °C 34 s,40 个循环;反应结束后进行生成溶解曲线的程序,即 95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s。

1.7 数据处理

用 T-RFs 的峰高所占总峰高的百分比作为相对丰度。去掉末端片断长度小于 30 bp 和相对丰度小于 1% 的 T-RFs,将相差 ± 1 bp 的 T-RFs 合并为同一个 T-RF^[13]。然后将数据用 SPSS 19.0 进行统计学分析,并计算丰富度 Richness (S)、多样性指数 Shannon-Weaner index (H') 和均匀度 Evenness (E)^[13]。Richness (S) = T-RFs 数量 ± 标准误; Shannon-Weaner index (H') = - Σ(p_i) ln(p_i); Evenness = H/lnS;其中 p_i = ni/N,ni 为单一 T-RF 的丰度值,N 为 T-RFs 的总丰度值,S 为样品 T-RFs 数量。用 Canoco 软件做对应分析 (correspondence analysis, CA)。用单因素方差 (ANOVA) 分析样品方差齐性,然后进行 Tukey 检验后比较样品之间的显著性差异。用 Quantity One 软件分析 DGGE 图谱,根据 unweighted pair group method clustering (UPG-

MA) 算法构建树状图。T-RFs 信息上传至 T-RFLP 在线比对网站 MICA: Microbial Community Analysis III (<http://mica.ibest.uidaho.edu/runpat.php>) 上进行比对。

2 结果与分析

2.1 T-RFLP 分析结果

2.1.1 细菌多样性分析

肠道各部位的丰富度、多样性、均匀度,结果见表 1。结果表明粪便中细菌多样性指数最高,为 2.30,显著高于小肠三个部位的内容物 (P < 0.05);大肠中结肠的细菌多样性指数为 2.23,盲肠的为 2.17,直肠的为 2.30,与粪便中细菌多样性指数差异无显著性 (P > 0.05);而小肠内容物中细菌的多样性指数显著低于大肠和粪便,回肠、空肠和十二指肠部位分别为 1.68、1.61 和 1.90,其中十二指肠部位细菌多样性指数又显著高于回肠和空肠部位的。大肠和粪便中细菌的丰富度和均匀度亦明显高于小肠部位。

表 1 BALB/c 小鼠肠道各部位内容物及粪便中细菌多样性分析

Tab.1 Diversity analysis of the bacterial community in different sites of the intestines and feces of BALB/c mice

部位 Position	丰富度 Richness (S)	均匀度 Evenness (E)	香农-威纳多样性指数 Shannon-Weaner index (H')
粪便 Feces	16.75 ± 0.48 ^a	0.84 ± 0.02 ^a	2.37 ± 0.07 ^a
直肠 rectum	16.00 ± 1.41 ^a	0.82 ± 0.02 ^a	2.30 ± 0.08 ^a
结肠 colon	15.25 ± 1.25 ^a	0.82 ± 0.03 ^a	2.23 ± 0.12 ^a
盲肠 cecum	14.75 ± 0.85 ^b	0.81 ± 0.04 ^a	2.17 ± 0.09 ^a
回肠 ileum	9.00 ± 1.00 ^c	0.77 ± 0.02 ^b	1.68 ± 0.10 ^c
空肠 jejunum	9.50 ± 1.19 ^c	0.72 ± 0.04 ^b	1.61 ± 0.140 ^c
十二指肠 duodenum	12.50 ± 3.27 ^b	0.79 ± 0.06 ^b	1.90 ± 0.24 ^b

注:用字母 a,b 或 c 表示各部位之间的差异 (P < 0.05);结果为 4 个重复,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

Note. Significant differences (P < 0.05) between the parts are shown with letters a, b, or c; The results are $\bar{x} \pm s$, n = 4 for each method measurement.

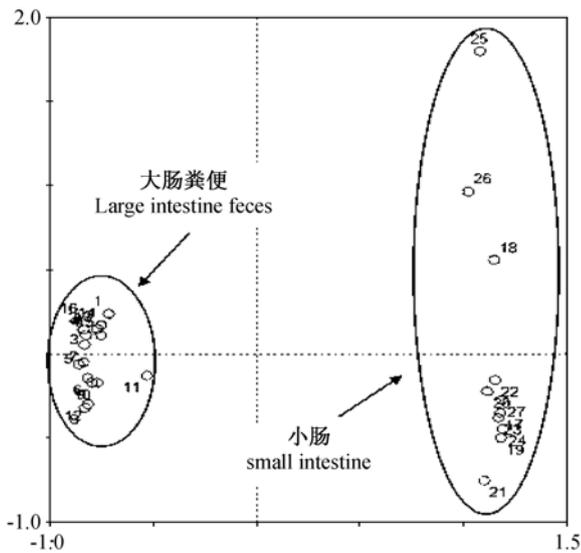
2.1.2 肠道各部位之间细菌群落结构分析

对应 (CA) 分析结果如图 1 所示,其中去掉一个明显离群的十二指肠样品。图中的 1-16 代表大肠内容物和粪便样品,它们紧密的聚在一起,表明他们的细菌群落组成十分相似且不同 BALB/c 小鼠大肠各部位内容物相似性较高且重复性好。17-27 代表小肠内容物,其中 18 (回肠),25 (十二指肠),26 (十二指肠) 明显与其他小肠样品的成分相差较大,表明 BALB/c 小鼠小肠各部位内容物相似度和重复性不如大肠部位的高。粪便和大肠样品聚集在一起,与小肠样品分别位于二维轴的两端,表明 T-RFs 反映出的 BALB/c 小鼠的粪便和大肠内容物的细菌

组成比较相似,而与小肠内容物组成差异较大。

2.1.3 优势菌群分析

根据 T-RFs 在样品中的峰度值用 Excel 生成堆积柱状图 2。在粪便、直肠和结肠中 244、255 bp 和 449 bp 占有的比重较高 (6.95% ~ 42.71%), 为优势 T-RFs,表明在这些肠道部位中共同存在着一些优势菌群;而这些 T-RFs 在盲肠中存在但所占的比重明显减小,表明盲肠部位细菌的优势菌群有所改变。此外,大肠和粪便中共同拥有许多其他的 T-RFs, 如 60、183、261、265、426 bp 和 437 bp 等,表明大肠部位和粪便中细菌的组成相似度较高。不同于大肠部位和粪便样品,小肠部位的内容物中优势 T-



注:1~4. 粪便;5~8. 直肠;9~12. 结肠;13~16. 盲肠;17~20. 回肠;21~24. 空肠;25~27. 十二指肠。

图 1 细菌群落结构 CA 分析

Note. 1-4. Feces; 4-8. Rectum; 9-12. Colon; 13-16. Cecum; 17-20. Ileum; 21-24. Jejunum; 25-27. Duodenum.

Fig. 1 CA analysis of the bacterial community composition.

RFs 则为 60、73、261、268 bp 和 272 bp (4.01% ~ 55.14%)。其中 60 bp 在小肠中占有的比重最高 (19.33% ~ 61.15%)，但是沿着肠道向下比率逐渐的减小,73 bp 只存在于小肠中,将 T-RFs 信息上传

至在线比对网站 MICA 上发现,60 bp 代表乳杆菌属 (*Lactobacillus*),而 73 bp 代表克雷伯菌属 (*Klebsiella*)。

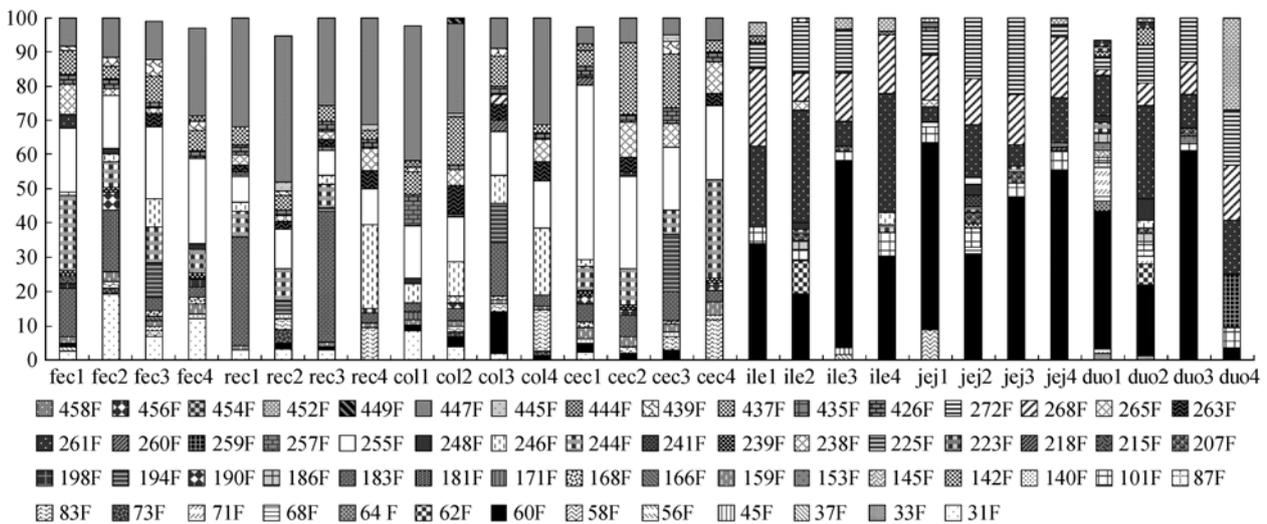
2.2 DGGE 分析

如图 3 所示,粪便和大肠各部位条带较小肠多,表明粪便和大肠内容物较小肠拥有更多的细菌种类;粪便和大肠拥有的优势条带相同,小肠部位的优势条带与大肠不同,与 T-RFLP 结果相一致。

进一步用 Quantity One 软件分析 DGGE 图谱,得到聚类分析树状图(图 4)。除一个粪便样品外,树状图中粪便和大肠各部位聚集成一簇,空肠和回肠样品聚集成一簇,说明大肠和粪便的细菌群落组成相似性较高,与小肠样品相似性较低,十二直肠内容物中细菌与粪便及空肠、回肠差别较大。

2.3 荧光定量 PCR 分析结果

荧光定量 PCR 分析各部位细菌丰度,结果如图 5 所示,小鼠肠道中,小肠部位的十二指肠和空肠内容物中细菌丰度分别为 6.9 log (copies)/g 和 8.3 log (copies)/g;粪便中细菌丰度高达 11.8 log (copies)/g,显著高于十二指肠和回肠这两个小肠部位 ($P < 0.05$),约为十二指肠的 2 倍,而与大肠各部位及回肠内容物中细菌的丰度相当,差异无显著性 ($P > 0.05$)。

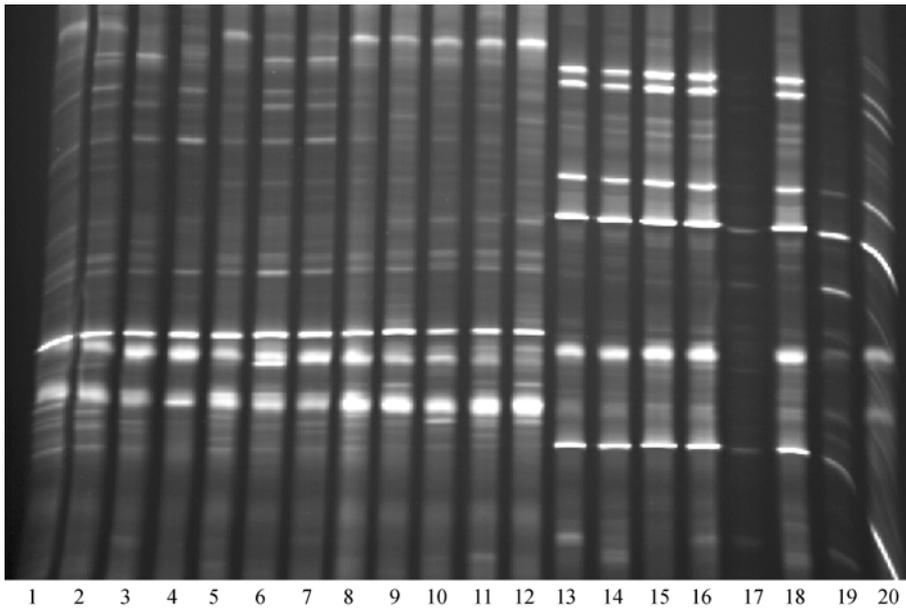


注:Fec:粪便;rec:直肠;col:结肠;cec:盲肠;ile:回肠;jej:空肠;duo:十二指肠。样品后边的数字代表小鼠编号,如,col 1 代表 1 号小鼠的结肠。

图 2 细菌 T-RFLP 分析柱状图

Note. Fec: Feces; rec: Rectum; col: Colon; cec: Cecum; ile: Ileum; jej: Jejunum; duo: Duodenum. The number following the sample stands for the mouse number. For example, col 1 stands for the colon of the first mouse.

Fig. 2 T-RFLP patterns of the bacterial populations.

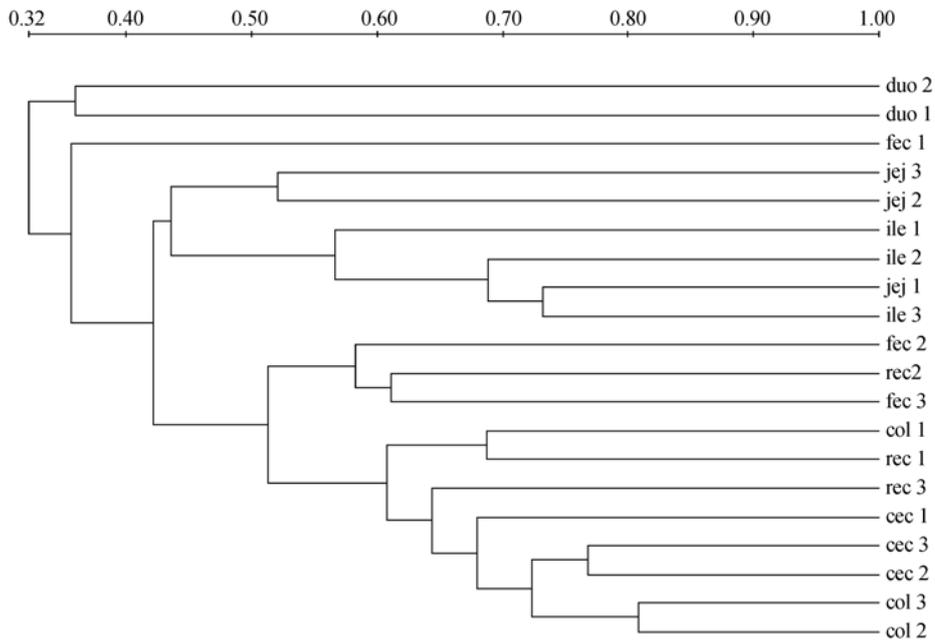


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 注:1~3. 粪便;4~6. 直肠;7~9. 结肠;10~12. 盲肠;13~15. 回肠;16~18. 空肠;19~20. 十二指肠。

图 3 16 S rDNA 的 PCR-DGGE 分析图谱

Note. Feces: 1 - 3; Rectum: 4 - 6; Colon: 7 - 9; Cecum: 10 - 12; Ileum: 13 - 15; Jejunum: 16 - 18; Duodenum: 19 - 20.

Fig. 3 The 16S rDNA PCR-DGGE profiles



注: fec: 粪便; rec: 直肠; col: 结肠; cec: 盲肠; jej: 空肠; ile: 盲肠; duo: 十二指肠。

图 4 DGGE 图谱聚类分析树状图

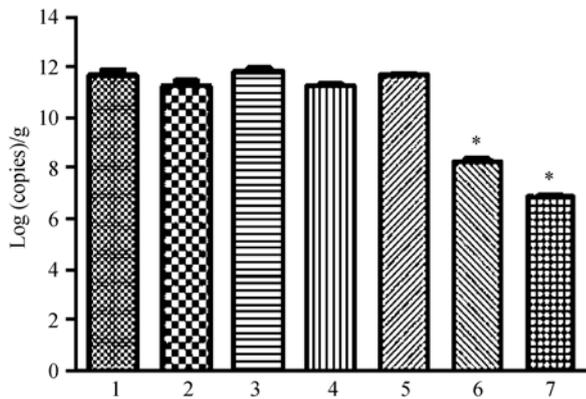
Note. fec: Feces; rec: Rectum; col: Colon; cec: Cecum; ile: Ileum; jej: Jejunum; duo: Duodenum.

Fig. 4 Cluster analysis of the DGGE profiles

3 讨论

肠道特有的环境使得体外分离培养肠道菌群存

在很大的局限性^[14]; 基于 PCR 的方法目前已被广泛应用于微生物分子生态学研究^[15,16], 其中 T-RFLP 技术用限制性内切酶将 DNA 酶切成不同的末



注:1:粪便;2:直肠;3:结肠;4:盲肠;5:回肠;6:空肠;7:十二指肠,*, $P < 0.05$,与粪便样品差异有显著性。

图5 小鼠粪便及肠道内容物细菌丰度

Note. *, $P < 0.05$. 1. Feces; 2. Rectum; 3. Colon; 4. Cecum; 5. Ileum; 6. Jejunum; 7. Duodenum.

Fig. 5 The abundance of bacteria in the mouse intestines and feces.

端片段(T-RFs),相同长度的T-RFs在一定程度上代表一类物种,可高效直观地进行微生物群落结构的分析^[17];DGGE则利用变性剂梯度将长度相同但组成不同的DNA分开从而检测DNA的多态性等^[18]。本研究通过T-RFLP分析发现BALB/c小鼠肠道不同部位有其适合生存的特异性细菌种群,即优势的T-RFs,其中60 bp代表乳杆菌属(*Lactobacillus*),乳酸杆菌为兼性厌氧菌,60 bp片段自小肠到大肠丰度逐渐减少可能跟小肠至大肠氧气含量逐渐减少有关。PCR-DGGE分析结果与T-RFLP结果表现出一致的趋势:粪便与大肠部位内容物中细菌多样性相似,且明显高于小肠部位内容物;粪便和结直肠共同拥有一些优势菌群,表明粪便和结直肠的细菌群落结构相似。同时BALB/c小鼠粪便与大肠各部位之间在细菌丰度上亦十分相似,与空肠、十二指肠差异显著;且大肠各部位细菌丰度较为稳定,小肠各部位之间细菌丰度波动较大。小肠主要是消化和吸收营养物质的场所,该部位影响细菌分布的影响因素很多,如pH、消化液、分泌物和激素等,而相比之下大肠内部环境相对稳定,这可能是造成大肠内细菌丰度稳定性高于小肠的一个重要原因^[19]。

本实验中BALB/c小鼠大肠各部位之间细菌群落结构重复性较好,且与粪便中细菌组成相似,小肠各部位细菌群落与粪便差别显著且个体间差异较大,小鼠粪便并不能代表整个肠道内容物,而只适用于大肠部位特别是结直肠相关疾病的研究,如结直肠癌等;对小肠部位微生态与疾病的相关研究应该

选择其他合适的方法。除小鼠外,利用代谢产物来分析其他哺乳动物肠道微生态也是科研人员常用的方法,如Ilmberger等^[20]用大象粪便反应其肠道微生态来研究大象的胃肠系统;赵立平等^[21]利用大熊猫粪便来检测大熊猫肠道微生物区动态,虽然不同物种间的胃肠道系统可能存在差异,但是本研究可为大型动物及稀有濒危哺乳动物的研究提供参考。

参 考 文 献

- [1] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65.
- [2] Mazmanian SK, Round JK, Kasper DK. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease [J]. Nature, 2008, 453(29): 620-625.
- [3] Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel diseases: current status and the future ahead [J]. Gastroenterology, 2014, 146(6): 1489-1499.
- [4] Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers [J]. ISME, J, 2012, 6(2): 320-329.
- [5] Fei N, Zhao L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice [J]. IMSE, 2013, 7(4): 880-884.
- [6] Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota [J]. Science, 2012, 338(6103): 120-123.
- [7] Etxeberria U, Arias N, Boqué N, et al. Shifts in microbiota species and fermentation products in a dietary model enriched in fat and sucrose [J]. Beneficial Microbes, 2014, 11: 1-5.
- [8] Rooks MG, Veiga P, Wardwell-Scott LH, et al. Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission [J]. ISME, 2014, 8(7): 1043-1417.
- [9] Mondot S, de Wouters T, Doré J, et al. The human gut microbiome and its dysfunctions [J]. Dig Dis, 2013, 31(3-4): 278-285.
- [10] Desai C, Madamwar D. Extraction of inhibitor-free metagenomic DNA from polluted sediments, compatible with molecular diversity analysis using adsorption and ion-exchange treatments [J]. Bioresour Technol, 2006, 98(4): 761-768.
- [11] 彭绪亚, 邸玉翠, 贾传兴, 等. 基于PCR-TGGE技术的餐厨垃圾厌氧消化微生物群落结构解析 [J]. 环境科学学报, 2012, 32(4): 960-967.
- [12] 张素珍, 李思施, 韦婷婷, 等. 基于PCR-DGGE的小鼠肠道菌群基因组提取方法的建立 [J]. 微生物学杂志, 2013, 33(5): 32-36.
- [13] Montes-Borrego M, Metsis M, Landa BB. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the olive crop across the Andalusian Landscape: factors driving community differentiation [J]. PLoS ONE, 2014, 9(5): e96397.

- [14] Ianiro G, Bibbò S, Gasbarrini A, et al. Therapeutic modulation of gut microbiota: current clinical applications and future perspectives [J]. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(8):762-770.
- [15] 高倩, 王有明, 吴旧生. 肠道菌群变化对实验小鼠肠黏膜免疫的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(5): 45-49.
- [16] 戴方伟, 宋晓明, 周莎桑, 等. 大鼠肠内容物细菌基因组 DNA 提取方法的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(3): 246-249.
- [17] Green BJ, Wiriyachaiyorn S, Grainge C, et al. Potentially pathogenic airway bacteria and neutrophilic inflammation in treatment resistant severe asthma [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(6): e100645.
- [18] 董莹, 何雪心, 于卓, 等. 实时荧光定量法和 PCR-DGGE 技术研究大肠癌患者肠道微生态特征 [J]. 2014, 34(7): 551-553.
- [19] Gu SH, Chen D, Zhang JN, et al. Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e74957.
- [20] Ilmberger N, Güllert S, Dannenberg, et al. A comparative metagenome survey of the fecal microbiota of a breast- and a plant-fed Asian elephant reveals an unexpectedly high diversity of glycoside hydrolase family enzymes [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(9): e106707.
- [21] 鲁海峰, 魏桂芳, 李仲逵, 等. ERIC-PCR 分子杂交技术分析大熊猫肠道菌群结构 [J]. *中国微生态学杂志*, 2005, 17(2): 81-84.

[收稿日期] 2015-01-04

(上接第 248 页)

- [7] 俞发荣, 连秀珍, 张红梅, 等. 慢性环境刺激对中国树鼩生殖生理的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2014, 30(5): 442-444.
- [8] 王逸, 卢聪, 宋广青, 等. 慢性束缚应激对 SD 和 Wistar 大鼠学习记忆能力的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(02): 40-44.
- [9] 周晨, 胡浪, 李天雪, 等. 应激所致肠功能紊乱大鼠模型的建立及内源性标志物的评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(6): 13-17, 2.
- [10] 王超, 赵传超, 施忠秋, 等. 热应激对小鼠器官指数、小肠损伤及胃 HSP70 mRNA 表达的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(5): 63-66, 10.
- [11] 李征, 于生元, 梁景耀, 等. 反复电刺激大鼠上矢状窦后的抑郁行为学表现 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(2): 6-10.
- [12] 汤冠荣, 蒋锐, 姜正林, 等. 前庭功能锻炼对运动病大鼠血浆应激相关激素水平的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(6): 1065-1069.
- [13] 王吉文, 丘宇茹, 符少萍, 等. 大鼠脑缺血/再灌注致心肌损伤中心肌内皮素和去甲肾上腺素的表达 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2008, 19(6): 695-700.
- [14] Mitchell A, Rushentsova U, Siffert W, et al. The angiotensin II receptor antagonist valsartan inhibits endothelin 1-induced vasoconstriction in the skin microcirculation in humans in vivo; influence of the G-protein beta3 subunit (GNB3) C825T polymorphism [J]. *Clin Pharmacol Ther*. 2006, 79(3): 274-281.
- [15] 刘占东, 鲍晓力, 张进禄, 等. 慢性应激状态下大鼠睾酮水平测定 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 19(6): 526-529.
- [16] 谈世进, 王艳妮, 丁在咸. 睾酮水平的变化对雄性大鼠血管内皮功能的影响 [J]. *同济大学学报(医学版)*, 2012, 33(6): 27-30.

[收稿日期] 2014-12-18